Vitellogenin-Vorkommen bei Drohnen der Honigbiene (Apis mellifera L.)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
MARTINA TRENCZEK
aus Leipzig

1984

Vitellogenin-Vorkommen bei Drohnen der Honigbiene (Apis mellifera L.)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
MARTINA TRENCZEK
aus Leipzig

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	7. Dezember 1984
Dekan:	Professor Dr. H. U. Seitz
1. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Engels
2. Berichterstatter:	Privat-Dozent Dr. H.-J. Lipps

Irrtümer haben ihren Wert;
jedoch nur hie und da.
Nicht jeder, der nach Indien fährt
entdeckt Amerika.

Erich Kästner

Dank

Für die vertrauensvolle Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Engels danken.

Mein besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe H.J. Lipps, P. Beck, H. Kraut, W. Steinhilber und Frau M. Wieser für ihre ständige Bereitschaft, mir bei den biochemischen Auswertungen meiner Versuche mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Herrn W. Noé möchte ich nicht nur für die Einführung in die Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie danken, sondern ebenso für das geduldige Zuhören in allen Notlagen.

Herrn K. Hartfelder, Herrn H.H. Kaatz und Frau Z. Paulino Simoes danke ich für ihre rege Diskussion und Zusammenarbeit, Frau Z. Paulino Simoes besonders für die Erlaubnis unveröffentlichte Ergebnisse ihrer Arbeit zitieren zu dürfen.

Für die Überlassung der DNS-Klone von Drosophila und Gallus möchte ich mich bei Herrn B. Hovemann und Herrn T. Schuster bedanken.

Viele Tips und Tricks zur Aufzucht diploider Drohnen erhielt ich von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. J. Woyke (Warschau/Polen). Der Aufenthalt in der Bienen-Abteilung der Landwirtschaftlichen Universität Warschau wurde durch den DAAD und die Polnische Akademie der Wissenschaften (PAN) unterstützt.

Herrn Imkermeister G. Staemmler sei für seine praktische Hilfe und allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Entwicklungsphysiologie für ihre freundschaftliche Arbeitsathmosphäre ebenfalls Dank ausgesprochen.

Zuletzt möchte ich auch noch all jenen herzlich danken, - ganz besonders meinen Eltern und meinem Bruder (für's Brotholen) - die im privaten Hintergrund, die Durchführung dieser Arbeit ermöglichten und mich auch auf diesem Gebiet promovieren ließen.

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
	Abkürzungen	8
II.	Material und Methoden	1o
1.1.	Chemikalien	1o
1.2.	Puffer, Lösungen	1o
1.3.	Diäten	14
1.4.	Fotographische Dokumentation	15
1.5.	Versuchstiere	16
2.	Behandlung der Versuchstiere	16
2.1.	Juvenilhormon-Behandlung	16
2.2.	Ecdyson-Behandlung	17
3.	Diploide Drohnen	17
3.1.	Königinnenzucht	17
3.2.	Aufzucht der diploiden Drohnen	18
3.3.	Untersuchungen an diploiden Drohnen	18
3.3.1.	Biometrische Messungen	19
3.3.2.	DNS-Gehalt	19
4.	Aufarbeitung der Versuchstiere	2o
4.1.	Hämolymph-Präparation	2o
4.2.	Eihomogenat	2o
4.3.	Fettkörper	21
5.	Protein-Bestimmungen	21
5.1.	Gesamtprotein-Titer	21
5.2.	Protein-Spektren	21
5.2.1.	native PAGE	21
5.2.1.1.	Molekulargewichts-Bestimmung	22
5.2.2.	SDS-PAGE	22
5.2.2.1.	Molekulargewichts-Bestimmung	22
5.2.3.	2-dimensionale PA-Gele	23

5.2.4. Fixierung und Färbung der Gele 24
5.2.4.1. Routine-Färbung mit Coomassie Blue R 25o 24
5.2.4.2. Silberfärbung 24
5.2.4.3. PAS-Färbung auf Kohlenhydrate 25
5.2.4.4. Nachweis von Lipo-Proteinen 25
5.2.4.5. Nachweis von Phospho-Proteinen 26
5.3. "Western-Blotting" mit anschließendem Protein-Nachweis mittels Antikörper 26
5.4. Peptid-mapping 28
5.5. Kombination von Peptid-mapping und Western-Blot mit PAP 29

6. Antiseren 29
6.1. Herstellung der Antiseren 29
6.1.1. Antiserum gegen Arbeiterinnen-Hämolymphe 29
6.1.2. Antiserum gegen Drohnen-Hämolymphe 3o
6.1.3. Vergleichsseren 3o
6.1.4. Antiseren gegen Vitellogenin 3o
6.1.4.1. Anti-Vg(H)-Serum 3o
6.1.4.2. Anti-Vg(T)-Serum 3o
6.2. Immunologische Untersuchungen 31
6.2.1. 2-dimensionale Immun-Elektrophorese 31
6.2.2. Line-Immun-Elektrophorese 32
6.2.3. Quantitative Immun-Elektrophorese 32

7. Säulen-Chromatographie 32
7.1. Protein-Trennung über Anionen-Austauscher 32
7.2. Molekulargewichts-Bestimmung über Molekularsieb-säulen 33

III. Ergebnisse 34

1. Diploide Drohnen 34
1.1. Volle künstliche Aufzucht 34
1.2. Halb-künstliche Aufzucht 34

2.	Biometrische Messungen	35
2.1.	Gewicht	35
2.2.	Flügel-Häkchenzahl	35
2.3.	Testes und Spermien	36
2.4.	DNS-Gehalt der Spermien	38
3.	Qualitative Protein-Analysen	39
3.1.	Charakterisierung der Hämolymph-Proteine mit nativer PAGE	39
3.2.	Allgemeine Charakterisierung der Hämolymph-Proteine mit SDS-PAGE	41
3.3.	Proteine der Drohnen	46
3.3.1.	Übersicht	46
3.3.2.	Vitellogenin	48
3.4.	Seren-Testung	49
3.4.1.	Anti-Vg(H)-Serum	49
3.4.2.	Anti-Vg(T)-Serum	49
3.5.	Immunologischer Nachweis des Vitellogenins in der Drohnen-Hämolymphe	52
3.5.1.	2-dimensionale Immun-Elektrophorese	52
3.5.2.	"Western-Blotting" mit anschließendem PAP-gekoppelten Immun-Nachweis	52
3.6.	Charakterisierung der Polypeptide a, b und f	56
3.6.1.	Protein-Vergleich durch Peptid-mapping	57
3.6.2.	Proteinanalyse mittels Säulen-Chromatographie	6o
4.	Quantitative Protein-Untersuchungen	63
4.1.	Linearität der Protein-Bestimmung	63
4.2.	Hämolymphmenge und Protein-Gehalt	63
4.3.	Gesamtprotein-Gehalt in der Hämolymphe von Drohnen	65
4.4.	Vitellogenin-Gehalt der Drohnen	66
4.4.1.	Vitellogenin-Gehalt und Gesamtprotein-Gehalt	66
4.4.2.	Vitellogenin-Gehalt haploider Drohnen	66
4.5.	Protein-Untersuchungen an diploiden Drohnen	68

5.	Hormon-Applikationen	7o
5.1.	Gesamtprotein-Titer der Hämolymphe	7o
5.1.1.	Dosis-Abhängigkeit der JH-Wirkung	71
5.1.2.	Einfluß der Inkubations-Zeit	71
5.1.3.	Einfluß des Alters	72
5.2.	Vitellogenin-Gehalt	72
5.3.	Beobachtungen über andere Hämolymph-Proteine	74
6.	Juvenilhormon-Bestimmung	76
7.	Isolierung der DNS und Restriktions-Analyse	76
7.1.	Hybridisierungs-Experimente	76
IV.	Diskussion	78
	Charakterisierung der Bienenproteine Vitellogenin und Vitellin	78
	Weibchen-Spezifität des Vitellogenin-Vorkommens	81
	Hormonelle Regulation des Vitellogenin-Vorkommens	84
	Genetische Kontrolle des Vitellogenin-Titers	89
	Charakterisierung der diploiden Drohnen	92
	Vitellogenin-Titer der Drohnen	92
	Gen-Dosis-Effekt	95
	Ausblick	97
	Induktion neuer Proteine	98
	Hybridisierungs-Experimente	lol
V.	Zusammenfassung	lo4
VI.	Anhang	lo7
VI.	Literaturverzeichnis	111
VII.	Lebenslauf	

I.
Einleitung

Vitellogenine sind Dotterprotein-Vorstufen, die bei Vertebraten in der Leber (Ranney & Chaikoff, 1951 und Rudack & Wallace, 1968 zit. aus Bergink et al. 1974) und bei Insekten hauptsächlich im Fettkörper (Pan et al.,1969) synthetisiert werden. Von hier werden sie im Blut bzw. in der Hämolymphe zum Ovar transportiert und dort pinocytotisch in die wachsenden Oocyten aufgenommen (Telfer & Rutberg, 1960; Bier, 1963; Wallace & Dumant, 1968). Der Aufnahmeprozeß wird als Vitellogenese bezeichnet.
Das in der Oocyte vorliegende Dotterprotein ist meist eine Variante des Vitellogenins und wird nun als Vitellin bezeichnet.
Seine Funktion ist die Ernährung des sich entwickelnden Embryo.

Die Synthese des Vitellogenins wird bei den Vertebraten durch das Steroidhormon Östrogen (Wallace & Jared, 1968), bei den Insekten entweder durch Ecdyson (Fallon et al. 1974; vgl. Hagedorn & Kunkel, 1979), ebenfalls ein Steroidhormon und/oder durch Juvenilhormon (vgl. Wyatt & Pan 1978 und Engelmann 1979) reguliert. Bei Vertebraten steht die Vitellogenese unter dem Einfluß von Gonadotropinen (Wahli et al., 1981) und bei vielen Insekten unter dem von Juvenilhormon (Engelmann, 1979).

Untersuchungen über Synthese, Sekretion, Titer, Transport und Aufnahme von Vitellogenin ermöglichen eine Aufklärung entwicklungsphysiologischer Vorgänge bei oviparen Vertebraten und Insekten. Ergebnisse hierüber können auch für die Theoriebildung über Genexpression und deren Regulation in eukaryotischen Organismen hilfreiche Modellvorstellungen liefern.

Das Vitellogenin-Vorkommen ist i. d. R. auf die Weibchen beschränkt. Vitellogenine werden daher auch als weibchen-spezifische Proteine bezeichnet. Die Synthese und das Ansteigen des Vitellogenintiters

konnte aber auch in Männchen von Amphibien (XENOPUS LAEVIS: Wallace & Jared, 1968; Wangh & Knowland, 1975) und Vögeln (GALLUS DOMESTICUS: Bergink et al., 1974) durch die Injektion von Östrogen (17ß-Östradiol) induziert werden.
Vergleichbare Ergebnisse liegen bei Insekten vor. So konnten Huybrechts & de Loof (1977) bei SARCOPHAGA BULLATA und Postlethwait et al. (198o) bei DROSOPHILA MELANOGASTER durch Behandlung mit 2o-Hydroxy-Ecdyson und Dhadialla & Wyatt (1981) bei LOCUSTA MIGRATORIA durch JH die Vitellogeninsynthese bei den Männchen induzieren. Mundall et al. (1979, 1983) fanden nach Applikation mit ZR 512, einem JH-Analogon, Vitellogenin in der Hämolymphe der Männchen von DIPLOPTERA PUNCTATA.
Bei einigen Insektenarten kommt Vitellogenin bei Männchen, wenn auch im Vergleich zu den Weibchen in weitaus geringeren Mengen, bereits unter normalen physiologischen Bedingungen vor, obwohl für es keine funktionelle Notwendigkeit besteht. Dies ist u.a. bei HYALOPHORA CECROPIA (Telfer, 1954) und RHODNIUS PROLIXUS (Chalaye, 1979) der Fall.

Für die Regulation der Genloci können folgende Hypothesen formuliert werden:
Eine Regulation findet statt
- über geschlechtsdeterminierende Gene,
- über Genaktivierung oder -reprimierung während der Differenzierung in weibliche und männliche Entwicklungsprogramme,
- über eine geschlechtsspezifisch unterschiedliche Hormonrezeptoren-Dichte am/im Syntheseorgan,
- oder über unterschiedliche Hormontiter in bestimmten Stadien.

Die bisher wohl umfassendsten Daten zu diesen Fragen liegen bei Insekten für DROSOPHILA, LEUCOPHAEA und LOCUSTA vor. Bei keiner dieser Arten ist jedoch bis heute ein letztendlich klärender Untersuchungsstand erreicht.

Bei Bienen (Apinae) und anderen sozialen Hymenopteren gibt es den Sonderfall zweier verschiedener Weibchentypen: eine subfertile Arbeiterinnenkaste und fertile Königinnen. Der Kastenpolymorphismus

bei Hymenopteren reicht von graduellen Unterschieden (Halictinae, Bombinae) bis hin zu einer bimodalen Verteilung morphometrischer Parameter und ausgeprägten Unterschieden in physiologischen Eigenschaften (Apis, Meliponinae, Formicinae u.a.).
Kasten-Unterschiede können in den meisten Fällen auf trophogene Faktoren während der Larvalentwicklung zurückgeführt werden (vgl. Haydak, 1943, Weaver, 1974 und Rembold & Lackner, 1981). Die Fertilität dieser Weibchen unterliegt nicht allein den individuellen physiologischen Gegebenheiten, sondern als äußerst einflußreicher externer Faktor kommt hier das soziale Gefüge innerhalb der Staaten hinzu. So gehen z.B. subfertile Arbeiterinnen in Eilage, wenn die Königin fehlt und nimmt die Eilage der Bienenkönigin in Völkern mit Schwarmstimmung ab. Isoliert gehaltene Königinnen zeigen bereits nach 4 Stunden eine stark reduzierte Vitellogenin-Synthese (Kaatz, persönl. Mitteilung).

Wie in bisher veröffentlichten Arbeiten beschrieben (Engels, 1972; Engels & Fahrenhorst, 1974; Rutz & Lüscher, 1974) fehlt den Männchen der Bienen (Drohnen) das Vitellogenin. Vereinzelte Beobachtungen von Fahrenhorst (1975), Hagmeister (1976) und Trenczek (1979) ließen jedoch auch ein Vitellogenin-Vorkommen bei Drohnen vermuten.
Ein eindeutiger Beweis wurde aber nicht erbracht, da sich das Serum als nicht monospezifisch erwies.

Da Drohnen normalerweise aus unbesamten und somit unbefruchteten, haploiden Eiern entstehen, könnte das allgemein beschriebenen Fehlen des Vitellogenins in der Drohnen-Hämolymphe außer auf die oben aufgeführten Überlegungen auch auf einen Gen-Dosis-Effekt zurückzuführen sein.
Der Nachweis, daß diploide Drohnen aus befruchteten Eiern bei Homozygotie des geschlechts-determinierenden Genlocus entstehen (Woyke, 1962, 1963 a und b), 1965)kann zu Klärung dieser Fragestellung herangezogen werden.

Zum Verständnis der Geschlechtsbestimmung bei Bienen seien zunächst die bestehenden Hypothesen vorgestellt:

- Hypothese der cytoplasmatischen Balance:
Diese Hypothese ordnet dem Cytoplasma männlich-determinierende und den Chromosomen weiblich-determinierende Faktoren zu. Das Geschlecht wird durch die Balance dieser Faktoren bestimmt (zit. aus Kerr & Laidlaw, 1956).

- Die Multiple-Sex-Allel-Hypothese:
Das Geschlecht wird durch eine Serie von Allelen eines Locus bestimmt. Im heterozygoten Zustand entstehen Weibchen, im homo- bzw. hemizygoten Fall dagegen Männchen (Whiting,1939 für Habrobracon; vgl. A. Whiting; Mackensen, 1951 für Apis).
Der Fall, daß mehrere Loci (multiple-Sex-Loci) bei der Geschlechtsbestimmung beteiligt sind (Crozier, 1971) ist von dem eines Locus mit multiplen Allelen experimentell kaum unterscheidbar.

- Die Gen-Balance-Hypothese:

Diese Hypothese geht auf das von Bridges (1916, 1925) für DROSOPHILA entwickelte Modell der Gen-Balance zurück. Nach der für Bienen modifizierten Form dieser Hypothese entsteht das Geschlecht durch das Zusammenwirken weiblich determinierender Gene (f) mit kumulativen bzw. fast vollständig kumulativen Effekten und männlich determinierenden Genen (m) ohne bzw. mit nur schwach kumulativen Effekten (Cunha & Kerr, 1957; leicht verändert Kerr, 1967 und Chaud-Netto, 1975). Es gilt dann:

für haploide Organismen: $am + bf \longrightarrow M > F$ (Drohnen)

für diploide Organismen: $2am + 2bf \longrightarrow M < F$ (Weibchen)

m = männlich determinierende Gene
f = weiblich determinierende Gene
M = maskulinisierender Effekt
F = feminisierender Effekt
a und b = konstante ganzzahlige Faktoren

Nach Cunha und Kerr (1957) hat eines der f-Gene (das X-Gen) seine kumulative Wirkung verloren, soweit es nicht heterozygot vorliegt; es gilt dann:

haploid: $am + bf + X_1 \longrightarrow M > F$ (Drohn)
$am + bf + X_2 \longrightarrow M > F$ (Drohn)

diploid heterozygot:

$2am + 2bf + X_1X_2 \longrightarrow M < F$ (Weibchen)
$2am + 2bf + X_2X_1 \longrightarrow M < F$ (Weibchen)

diploid homozygot:

$2am + 2bf + X_1X_1 \longrightarrow M > F$ (Drohn)
$2am + 2bf + X_2X_2 \longrightarrow M > F$ (Drohn)

Wird das Vitellogenin-Vorkommen bei Bienen über einen Gen-Dosis-Effekt reguliert, so ist bei den diploiden Drohnen ähnlich wie bei den diploiden Weibchen im Vergleich zu den haploiden Männchen eine höhere Vitellogeninsynthese bzw. ein erhöhter Vitellogenintiter zu erwarten. Eine evtl. nur geringe Erhöhung des Vitellogenin-Titers oder der Vitellogenin-Synthese könnte auf eine fehlende Kopplung des Vitellogenin-Gens an den geschlechts-determinierenden Locus zurückzuführen sein, wobei das Vitellogenin-Gen in bis zu 5o% der Fälle heterozygot vorliegen kann. Unter der Annahme, daß ein Gen-Dosis-Effekt nur in einer heterozygoten Konstellation des Vitellogenin-Gens auftritt, müßte ein Teil der diploiden Drohnen einen erhöhten, der andere Teil einen den haploiden Drohnen entsprechenden Vitellogenin-Titer aufweisen.
Der Vorteil gegenüber den bisher durchgeführten morphometrischen Untersuchungen (Woyke 1973 a, 1977 a, 1978 a; Chaud-Netto, 1977 und Kerr & Nielson,1967) liegt darin, daß die Untersuchung eines Proteins, dem direkten Translationsprodukt, der primären Genwirkung einige Schritte näher ist.

Hängt jedoch die Regulation des Vitellogeninstoffwechsels direkt von der Geschlechtsdetermination ab, z.B. durch Epistasis des X-Gens über das Vitellogenin-Gen oder über eine von Engels et al. (1975) postulierte geschlechtsabhängige Fettkörperkompetenz, so sollten

die experimentellen Daten zur Vitellogeninsynthese und des Vitellogenintiters bei diploiden Drohnen denen der haploiden entsprechen.

Das Vitellogeninvorkonmmen bei Bienen kann nun unter folgenden Gesichtspunkten diskutiert werden:

- Besteht ein Gen-Dosis-Effekt?
- Wird das Vitellogeninvorkommen über Geschlechtsgene bzw. -allele oder durch weiblich determinierende Gene reguliert?
- Findet eine hormonelle Regulation über geschlechtsspezifische Hormontiter oder Hormonrezeptoren-Unterschiede statt?

Von diesen Überlegungen ausgehend wurden die anschließenden Untersuchungen durchgeführt:

- biochemische Charakterisierung der Hämolymphproteine, insbesondere des Vitellogenins,
- Protein- und Hormonbestimmungen haploider Drohnen
- Proteinuntersuchungen bei diploiden Dronen
- der Einfluß von Hormonbehandlungen auf haploide Drohnen
  Für diese Untersuchungen wurde hauptsächlich JH III, das für Bienen identifizierte Juvenilhormon (Trautman et al., 1974), eingesetzt, da Versuche von Rutz et al. (1976), Imboden et al., (1976) an Bienen und Röseler (1977) an Hummeln den Hinweis gaben, daß dieses Hormon an der Regulation des Vitellogeninstoffwechsels bei Hymenopteren beteiligt ist. Vorversuche mit JH III Applikationen ließen auch einen Einfluß auf das Vitellogeninvorkommen bei Drohnen vermuten (Trenczek, 1979).

Die Ähnlichkeiten der Vitellogenine verschiedener Insektenarten wie ihre fast durchgängige Zusammensetzung aus hoch- und niedermolekularen Untereinheiten (16o -23o K und 45 - 8o K) zu sehr großen nativen Molekülen, veranlaßten mich zu der Überlegung, ob die Vitellogenine in einer Verwandschaftsbeziehung zueinander stehen könnten. Bisherige

Untersuchungen von Fahrenhorst (1975) und Hagmeister (1976) zeigten mittels immunologischer Kreuztests eine interspezifische Verwandschaft der Vitellogenine innerhalb der 4 rezenten Apisarten.

Da geringe Veränderungen in der Nukleotidsequenz der Proteinloci bereits zu starken Veränderungen bzgl. der Tertiärstruktur des Translationsproduktes , hier dem Vitellogenin, führen können, sind immunologische Methoden nicht ausreichend, alle durch Verwandtschaftsbeziehungen bestehenden Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz von Proteinen voll zu erfassen. Es wurde daher versucht , eine eventuelle Übereinstimmung verschiedener Vitellogenine direkt am Genom durch Hybridisierungsexperimente zu erfassen.

Abkürzungen

Abb. = Abbildung
a.bidest = Millipore-gefiltertes a.d.
a.d. = entmineralisiertes Wasser
Ag = Antigen
Ak = Antikörper
Anti- Vg = Antiserum gegen Vitellogenin
APS = Ammoniumpersulfat
bp = Basenpaare
BSA = Rinderserumalbumin
^{o}C = Temperatur in Grad Celsius
CA = Corpora allata
CC = Corpora cardiaca
Ci = Curie
cpm = Zerfälle pro Minute (counts per minute)
d = Dalton oder auch als Zeiteinheit Tag
dATP = Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP = " Cytosin " "
dGTP = " Guanosin " "
dTTP = " Thymidin " "
DNase = Desoxyribonuklease
DNS = Desoxyribonukleinsäure
DTT = Dithiothreitol
Ec = Ecdyson
EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure
EU = Enzymeinheit
EtOH = Äthanol
g = Erdbeschleunigung
h = Stunde
HAc = Essigsäure
HWM = Hoch-Molekulargewichtsmarker
IEP = Immunelektrophorese
JH = Juvenilhormon

JH/O = Juvenilhormon in Olivenöl
JH/H = Juvenilhormon in Hexan
IP = Isoelektrischer Punkt
K = Kilo-Dalton
LMW = Nieder-Molekulargewichtsmarker
LSP = "lipid-storage-protein"
M = Molarität
MPI = Max-Planck-Institut
MW = Molekulargewicht
M_r = Molekulargewicht-range
MeOH = Methanol
min = Minute
PAGE = Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP = Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS = Phosphatpuffer
Rf-Wert = relative Wanderungsstrecke
RNase = Ribonuklease
rpm = Umdrehungen pro Minute
SDS = Sodiumdodecylsulfat
SSC = NaCl-Na_3-Citrat-Puffer
T% = Acrylamidkonzentration in %
TCA = Trichloressigsäure
TEMED = N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
TRIS = Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Vg = Vitellogenin
Vt = Vitellin

Drosophila-Mutanten

da = daughterless
dsx = double-sex
ix = intersex
msl = male-specific-lethal
mle = maleless
slx = sex-lethal
tra = transformer

II.
Material und Methoden

1.1.
Chemikalien

Juvenilhormon III	-	Calbiochem
∝-Ecdyson	-	Calbiochem
Acrylamid	-	BDH und Electran
Molekulargewichtsmarker	-	BDH und Sigma
SDS	-	BDH
Kaninchen-anti-Peroxidase-Serum	-	DAKO
Schweine-anti-KanichenIgG-Serum	-	DAKO
^{32}P-∝-dCTP (spez. Aktivität 2ooo-3ooo mCi/mmol)	-	New England Nuclear
DNase I (=o,o2µg/ml)	-	Worthington
Polymerase I (E.coli)	-	BRL

Alle weiteren Chemikalien waren von Merck, Pharmacia, Serva, Sigma

1.2.
Puffer,Lösungen

Barbital-Puffer: o,o75 m; pH 8,6

Barbital-Na	131,4 g	
Barbital	2o,7 g	
Ca-Laktat	4,o g	auf 1o,o l

1ox Denhardt's (Denhardt, 1966)

Ficoll	o,2 %	
Polyvinylpyrolidon	o,2 %	
BSA	o,2 %	in 2-5xSSC

DNS-Probenpuffer

SDS	1,o %
EDTA	o,1 mM
Bromphenolblau	o,o1%
Glycerin	5o,o %

Harnstoff-Puffer (für PAP): pH 7,o

Urea	24o,24 g	(4M)	
NaCl	2,92 g	(5omM)	
Tris	1,2o g	(1omM)	auf 1l

Hybridisierungsmedium I (Vorinkubation)

2ox SSC	4,o ml	
1ox Denhardt's	1o,o ml	
SDS (2o%)	o,5 ml	
E.coli-DNA(1omg/ml)	o,1 µl	(denaturiert)
a.bidest	5,4 ml	

Hybridisierungsmedium II

2ox SSC	3,o ml	
1ox Denhardt'	6,o ml	
SDS (2o%)	o,3 ml	
E.coli-DNS (1omg/ml)	o,1 µl	(denaturiert)
a.d.	5,4 ml	

Lysier-Puffer: pH 9,5

NaCL	o,15 M
EDTA	o,25 - o,5o M
Tris	0.05 M
SDS	1,o %

PBS-Puffer (für PAP): pH 7,2

KCl	o,2o g	
NaCl	8,oo g	
KH_2PO_4	o,2o g	
$Na_2HPO_4xH_2O$	1,38 g	auf 1 l

PBS-Puffer (für Bradford-Test): pH 7,o 1o-fach

NaOH	31,o g	
KH_2PO_4	36,1 g	
NaCl	9o,o g	auf 1 l

Restriktionspuffer (1ox high-salt-Puffer, Schleif & Wensink, 1981)

NaCl	o,6 M
$MgCl_2$	6o mM
Tris pH 7,5	6o mM
DTT	1o mM
BSA	5oo µg/µl

Restriktionspuffer für Eco RI

NaCl	6o mM
$MgCl_2$	6 mM
Tris pH 7,5	15o mM
DTT	1 mM
BSA	5o µg/µl

5x Salz (Nicktranslation) pH 7,8

Tris	25o mM
$MgCl_2$	25 mM
ß-Mercaptoäthanol	5o mM
BSA	25o mg/ml

2ox SSC (Denhardt, 1966) pH 7,o

NaCl	3,o M
Na_3-Citrat	o,3 M

TE-Puffer: pH 7,5

Tris	5o mM
EDTA	5 mM

TES-Puffer pH 6,8

Tris	125 mM
EDTA	1 mM
SDS	o,1 %

TES/1o = TES-Puffer mit 1o% Glycerol
TES/2o = TES-Puffer mit 2o% Glycerol

Tris-Acetat-Puffer pH 7,8

Tris	4o mM
Na-Acetat	2o mM
EDTA	1 mM

Tris-Puffer für Immunelektrophoresen: pH 8,6 (22°C)

Kammer: o,3o M Tris/HCl
Gel: o,o6 M Tris/HCl

Tris-Puffer für PAGE:

Sammelgel-Puffer (SDS-PAGE): pH 6,8 ; o,25 M

Tris-HCl	39,4 g	
SDS	2,o g	auf 1 l

Trenngel-Puffer (SDS-PAGE): pH 8,8 ; o,75 M

Tris	71.o g	
Tris-HCl	47,2 g	
SDS	2,o g	auf 1 l

Elektroden-Puffer (SDS-PAGE): kein Einstellen des pH-Wertes

Tris	25 mM	6,6 g	
Glycin	192 mM	28,8 g	
SDS	o,2 %	2,o g	auf 2 l

(Alle nativen Gele wurden mit den gleichen Puffern, jedoch ohne SDS durchgeführt.)

Probenpuffer (SDS-PAGE):

Sammelgel-Puffer	6,25 ml
SDS	2,oo g
Glycerol	2,5o ml
Mercaptoäthanol	1,25 ml
a.bidest	15,oo ml

APS-Gehalt der Gele:

Sammelgel: 1,5oo %
Trenngel: o,o25 %

Tris-Gycin-Puffer (Blotting): pH 8,5 (ohne Einstellen)

Tris	25o mM
Glycin	1,92 M

Acrylamid-Stammlösung:

Acrylamid	3o,o g	
Bis-Acrylamid	o,8 g	auf loo ml a.d.

Standard-Fixier-Farblösung (PAGE):

Coomassie R-25o	1,25 g
Eisessig	46,oo ml
MeOH	227,oo ml
a.d.	227,oo ml

(für die IEP-Gele EtOH statt MeOH)

Lipoprotein-Farblösung:

für PAGE:

Sudan-Schwarz	o,5 % (w/v)
EtOH	9o %

für IEP:
Ölrot gesättigt in 6o% EtOH

Entfärber (PAGE):

EtOH	3o %
Eisessig	1o %

Entfärber (IEP):

EtOH	45 %
Eisessig	1o %

Silberfärbung:

Equilibrierlösung:

$AgNO_3$	2,oo g
a.bidest	7o,oo ml
NH_3 (min.25%)	3,5o ml
NaOH (o,36%)	5o,oo ml

Entwickler:

Zitronensäure	5o,oo mg	
Formaldehyd	o,5o ml	auf 1 l

Stopbad:

MeOH	5o %
Na-Thiosulfat	o,5 ml

1.3.
Diäten

I Gelée royale (Lagerung -2o °C)
II Gelée royale (frisch)
III Gelée royale (I) + 1o% a.d.
IV Gelée royale (I) + 15% a.d.
V MPI-Diät
VI MPI-Diät mit Mineralwasser ($-CO_2$) angesetzt
VII MPI-Diät + Gelée royale (I) (3:1)
VIII Gelée royale + Honig + MPI-Diät (2:o,5:o,5)

MPI-Diät:

a.bidest	14,5 mg
Glucose	2,5 g
Fructose	2,5 g
Hefe-Extrakt (Difco)	o,5 g
Gelée royale	2o,o g

1.4.
Fotografische Dokumentation

Kameras:
Canon F-1
Contax RTS

Objektive:

Canon FD	5o mm	1:1,4	
Vivitar (Canon)	9o mm	1:2,5	Macro
Canon FD	135 mm	1:2,8	
Contax	5o mm	1:1,14	Planar
Contax	6o mm	1:1,26	S-Planar.

Filter:

hama Orangefilter	(Coomassie Blue Färbung)
hama Grünfilter	(PAS-Färbung)
Blaufilter	(Silberfärbung)

Filme:
Agfa pan 25
Agfa ortho
Agfa pan loo

1.5.
Versuchstiere

Sämtliche Untersuchungen wurden mit Bienen der Rasse Apis mellifera carnica durchgeführt.
Um eventuelle Schwankungen oder Besonderheiten zwischen verschiedenen Völkern berücksichtigen zu können, wurden alle Proben den Zuchtlinien entsprechend getrennt markiert.

Es standen mir folgende Mutterköniginnen zur Verfügung:

144 x 1o12 x Hohenheim/8o	(Kennzeichen	A:= Ma19 ,=V51=76)
V6 x Hohenheim/79	("	B:= V17=77, V63)
S3 x H1	("	C:= Ma3)
S3 x Neuhalde	("	D:= V69)
S3 x Bärlochhütte	("	E:= V57)

(S3 und H1 sind institutsinterne Zuchtlinien-Bezeichnungen.)

2.
Behandlung der Versuchstiere

Die verdeckelten Drohnenwaben wurden kurz vor dem Schlüpftermin in einen Thermostaten mit 34,5°C und ca. 8o% rel. Luftfeuchtigkeit gebracht und die frisch schlüpfenden Tiere alle 24h abgesammelt. Ausnahmen ergaben sich bei besonderen Fragestellungen.
Die Drohnen wurden mit Opalithplättchen markiert und in weiselrichtigen Völkern mit Drohnenabsperrgittern eingesetzt. Behandelte Drohnen wurden in Kirchhainer-Begattungskästchen gehalten.

2.1.
Juvenilhormonbehandlung

JH III wurde in Olivenöl gelöst und o,5µl je Tier mit Hilfe einer Hamilton-1Oµl-Spritze lateral ins Abdomen injiziert.

Es wurden folgende Dosierungen angewandt:
o,1 - 0,5 - 1,o - 2,o - 5,o - 1o,o µg JHIII/Tier

Die Applikationszeiten betrugen:
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 Tage

Die Kontrollen wurden mit reinem Olivenöl (o,2 und o,5µl/Tier) sowie Hexan p.a. (o,5 µl) und Applikationszeiten von 1, 2, 3, 5 und 7 Tagen durchgeführt.

2.2.
Ecdysonbehandlung

Das eingesetzte α-Ecdyson wurde in Kalium-Ringer gelöst und in den Dosierungen 5o und 5oo ng/Tier eingesetzt.
Die Inkubationszeiten betrugen 2, 3 und 5 Tage.

3.
Diploide Drohnen

3.1.
Königinnenzucht

Alle Inzuchtkönniginnen stammen aus einer Geschwisteraufzucht aus der Serie S3 x H1 (1981). Es wurden 25%-Inzuchtserien (Schwester-Bruder-Paarung) und 5o%-Inzuchtserien (Mutter-Sohn-Paarung) angesetzt. Die künstliche Besamung erfolgte mit einem Besamungsgerät nach Mackensen & Roberts (1948).
Alle Parallelansätze konnten wegen des hohen Betreuungsaufwandes und der seit 1982 bestehendenen Beschränkungen in den Varroa-Sperrgebieten nicht aufrecht erhalten werden. So arbeitete ich letztendlich nur mit einer 25%-igen und einer 5o%-igen Inzuchtkönigin.

Die Besamung der Königinnen erfolgte nach dem in meiner Diplomarbeit angegebenen Zuchtschema (Trenczek, 1979).

3.2.
Aufzucht der diploiden Drohnen (vgl. Woyke 1969 a,b)

Die von den Inzuchtköniginnen frisch bestifteten Arbeiterinnenwaben wurden in einen Thermostaten mit 34,5±o,5 °C und 9o-95% rel. Luftfeuchtigkeit gehalten. Die frisch geschlüpften Larven wurden morgens und abends in die vorbereitete wächsernen Weiselnäpfchen aus laufenden Königinnenzuchten bzw. in Linbro®-disposo-trays umgelarvt. Einmal am Tag wurden die Larven auf frisches Futter umgesetzt, zweimal täglich die Futterbeschaffenheit kontrolliert und evtl. tote Larven entfernt. Als Indiz für die Vitalität der Larven diente die Stigmenbewegung. Während dieser Aufzuchtphase wurden verschiedene Diäten getestet. Als Beurteilungskriterium diente der prozentuale Anteil an überlebenden Larven. Am 4. bzw. 5. Tag wurden die Bienenlarven entweder im Thermostat weitergepflegt (volle künstliche Aufzucht) oder in vorbereitete Drohnenwaben umgelarvt und diese in weisellose Pflegevölker bis kurz vor dem zu erwarteten Schlüpftermin gegebenn (halb-künstliche Aufzucht).

3.3.
Untersuchungen an diploiden Drohnen

Die im Thermostat geschlüpften Drohnen wurden gewogen, mit numerierten Opalithplättchen gekennzeichnt und Kirchhainer-Pflegevölkchen zugesetzt.
Vor der Präparation der Tiere nach 1, 5 und 6 Tagen wurden sie wieder gewogen, Hämolymphe abgenommen, die Testes präpariert und vermessen sowie die Kopfkapsel geöffnet und sofort für die Plastikeinbettung fixiert.

3.3.1.
Biometrische Messungen

Nach Woyke (1973a, '74a, '77a, '78a,b) und Chaud-Netto (1978) wurden verschiedene Körperteile und -anhänge der Drohnen vermessen. Zur systematischen Auswertung gelangten nur das Gewicht und die Häkchenzahl am Hinterflügel.

3.3.2.
DNS-Gehalt

Im Alter von 5 und 6 Tagen können die Testes der Drohnen nicht mehr zur Bestimmung der Diploidie herangezogen werden (Woyke, 1973a). Da jedoch die Spermatogenese der diploiden Drohnen ähnlich wie die der haploiden Drohnen verläuft (Woyke & Skowronek, 1974), d.h. keine Trennung der homologen Chromosomen während der Metaphase I erfolgt, können die Spermien zur Bestimmung des DNS-Gehaltes verwendet werden. Es wurden Quetschpräparate der Testes für die photometrische Bestimmung des DNS-Gehaltes am UMSP II (Fa. Zeiss) einer Feulgenfärbung unterworfen. Als Referenz dienten gleich behandelte Kerne von Hühnererythrozyten.

Vorbereitung der Proben:

1. Fixierung in EtOH-Eisessig (3:1)	3o min
2. Mazerierung in 5o% Eisessig	2 min
3. Waschen in 7o% EtOH	1o min
4. Waschen in a.d.	1o min
5. Hydrolyse in 5 N HCl	4o min
6. Waschen in a.d.	5 min
7. Färbung in Schiff's Reagenz (Kühlschrank/dunkel)	3o min
8. Spülung SO_2-Wasser	5 min
9. Waschen in a.d. (2x)	5 min

1o.Alkoholreihe und über Xylol in Eukitt einbetten

SO_2-Wasser:

HCL 1N	5 ml
a.d.	9o ml
Na-metabisulfid (1o%)	5 ml

Meßeinstellung des UMSP II:

Wellenlänge	560 nm
Zeilenhub	o,5 µm
Zeilenlänge	12,o µm
Blende	2
Objektiv	1oo Ultrafluar 1,25; Glycerin

Absuchvorgang: mäanderförmig

Umrechnung: Extinktion= Meßwert x o,5 x o,5 (Arbeitseinheiten)

4.

Aufarbeitung der Versuchstiere

4.1.

Hämolymphpräparation

Die Hämolymphe von Drohnen wurde mit Blutzuckerpipetten (nach Folin) durchweg am abgeschnittenen Flügelstumpf abgenommen, um eine Kontamination der Hämolymphe mit Darminhaltsstoffen zu vermeiden.

Bei den Arbeiterinnen und Königinnen dagegen wurde die Hämolymphe mittels Herzpunktion durch einen Schnitt längs des 2. und 3. Abdominaltergites entommen. Die Hämolymphproben wurden alle sofort bei -2o°C tiefgefroren und bis zur Aufarbeitung bei dieser Temperatur aufbewahrt.

4.2.

Eihomogenat

Es wurden nur frisch abgelegte in den Zellen stehende Eier verwendet. Für die native PAGE in PBS (pH 7,o) und für SDS-PAGE in SDS-Probenpuffer sowie für die Immunelektrophorese in Tris-Puffer (o,o6 M, pH 8,6) aufgenommen , homogenisiert, bei 8ooo g zentrifugiert und der Überstand verwendet.

4.3.
Fettkörper

Das Fettkörpergewebe für die Proteinuntersuchungen wurde vor dem Homogenisieren 2x in eiskaltem Ringer gewaschen und dann wie unter 4.2. beschrieben weiterverarbeitet.

5.
Proteinbestimmungen

5.1.
Gesamtproteintiter

Der Gehalt an löslichen Proteinen in der Hämolymphe wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Lowry-Methode ist, daß sie gegen Interferenz durch Nichtproteine weniger anfällig ist.
Die Einsatzmengen betrugen 1 ml Bradford-Lösung und 1o µl Testlösung. Als Referenz diente BSA. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von λ = 595 nm.

Die Testlösung setzte sich aus 1 µl Hämolymphe und 29 µl PBS (pH 7,o) zusammen. Sie wurde bei 9ooo g zentrifugiert, um die Zellbestandteile der Hämolymphe zu entfernen.

5.2.
Proteinspektren

Die Charakterisierung der löslichen Hämolymphproteine erfolgte mit Hilfe verschiedener Elektrophoresesysteme.

5.2.1.
native PAGE

Es wurde mit 3-7%igen und 5-12,5%igen Gradienten-slab-Gelen gearbeitet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 4 °C in max. 4 Stunden bei 5o mA pro Gel.

5.2.1.1.
Molekulargewichtsbestimmung

Zur Bestimmung der nativen Proteinfraktionen, speziell der Vitellogeninfraktion wurde die Methode nach Hedrick & Smith (1968) und Slater (1969) herangezogen.
Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 5-3o% Gradientengel (2o% Saccharosezusatz in der 3o%igen Lösung) bei 4°C.

Molekulargewichtsmarker:

Ferritin	445 K
Katalase	24o K
Aldolase	16o K
BSA	68 K
Ovalbumin	45 K

5.2.2.
SDS-PAGE

Zur Bestimmung der Polypeptide wurden denaturierende SDS-Gradienten-slab-Gele verwendet. Der Acrylamid-Anteil der Trenngele betrug je nach Fragestellung linear 8% oder 11%, bzw. Gradienten von 3-7,5%, 3-1o% oder für die Routineuntersuchungen 5-12,5%. Acrylamid. Die Sammelgele hatten alle einen Anteil von 3% Acrylamid.

techn. Daten:
Geldicke: 1,5 mm
Trenngellänge. 11 - 12 cm
Proteinmengen: o,5 cm Taschen - 35 µg (BSA-Äqivalente)
1,o cm Taschen - 7o µg (BSA-Äqivalente)
Stromstärke: 15-2o mA/Gel
Zeit: über Nacht
Temperatur: Zimmertemperatur

5.2.2.1.
Molekulargewichtsbestimmung

Hierfür wurde die Methode nach Lambin (1978) angewandt. Die Beziehung

zwischen logMW und logT% erlaubt eine Molekulargewichtsbestimmung mit einer Streuung von durchschnittlich 5,5%. Glykoproteine mit mehr als 10% Kohlenhydratgehalt zeigen jedoch aufgrund geringerer SDS-Bindungsfähigkeit ein abweichendes Verhalten in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Ihr Molekulargewicht wurde daher nach Segrest & Jackson (1972) und Poduslo (1981) korrigiert.

Molekulargewichtsmarker:

Myosin	200 K
ß-Galaktosidase	116,25 K
Phosphorylase b	92,5 K
BSA	66/68 K
Ovalbumin	45 K
Carb.-Anhydrase	29-31 K
Chymotrypsin	25 K

Aufarbeitung der Proben

Die Hämolymphe wurde mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:2 versetzt, geschüttelt, bei 8000 g zentrifugiert , der Überstand 5 min gekocht und bei -20°Ckurzzeitig tiefgefroren.

5.2.3.

2-dimensionale Gele

Die Auftrennung in der ersten Dimension erfolgte wie in nativen 3-7%igen , 1,5mm dicken slab-Gelen. Anschließend wurden die Gele in die entsprechenden Probestreifen geschnitten und 1h bei leichtem Schütteln in SDS-Probenpuffer bei 4°C inkubiert. Es folgte ein weiteres Bad in frischem Probenpuffer bei Zimmertemperatur für eine weitere Stunde.

Für die zweite Dimension wurden 5-12,5%ige Gradienten-slab-Gele (Dicke 1,6mm) verwendet. Die vorbereiteten Gelstreifen , die einem nur schmalen 3%igem Sammelgel auflagen, wurden mit 1%iger SDS-haltiger Agarose überschichtet.
Der Elektrophoreselauf erfolgte wie unter 5.2.2.

5.2.4.
Fixierung und Färbung der Gele

5.2.4.1.
Routinefärbung mit Coomassie Blue R 25o

Die Gele wurden für mindestens 1h/mm Geldicke in einer o,1%igen Coomassie Blue R 25o - Fixier-Farblösung gefärbt und anschließend bis zu einem klaren Hintergrund entfärbt.

Fotografische Dokumentation: Agfa pan 25, Durchlicht, Orangefilter

Photometrische Auswertung : Chromoscan 2oo/2o1 von Joyce-Loeble
Wellenlängen: 53o nm (quantitativ), 57o/58onm (qualitativ)

5.2.4.2.
Silberfärbung

Für genauere Analysen wurde die empfindlichere Silberfärbung angewandt.

Behandlung der Gele:

1. Fixierung in 5o% MeOH (tech.)	2,o h
2. Equilibrieren in o,8%iger Silberlösung	1,5 h
3. Waschen in aqua bidest, mehrmaliges Wechseln	8,o min
4. Entwickeln unter Beobachtung	5-2o min
5. Stopbad	
6. Waschen in a.d.	

Fotografische Dokumentation: Apfa pan 25, Durchlicht, Blaufilter

Photometrische Auswertung: Chromoscan 2oo/2o1 von Joyce-Loeble
Wellenlänge: λ = 465 nm

5.2.4.3.
PAS-Färbung auf Kohlenhydrate

Zur Bestimmung Kohlenhydrat-haltiger Polypeptide wurde eine PAS-Färbung nach Segrest & Jackson (1972) durchgeführt. Es werden hiermit reduzierende Kohlenhydrate nachgewiesen. Zudem erlaubt diese Methode eine Nachfärbung mit Coomassie Blue.

Behandlung der Gele:

1. Fixieren 25% Isopropanol in 1o% Essigsäure	über Nacht
2. Waschen in 4o% EtOH in 1o% Essigsäure	2x 5 min
3. Oxidation in 1,5% Perjodsäure in 1o% Essigsäure (im Dunkeln bei 4°C)	3o min
4. Waschen in o,2% $Na_2S_2O_5$ in 1o% Essigsäure	3x 15 min
5. Färbung in Schiff' Reagenz (im Dunkeln)	2o min
6. Intensivierung in 45% EtOH	
7. Entfärben in a.d.	

Fotografische Dokumentation: Agfa pan 25, Durchlicht, Grünfilter

Photometrische Auswertung: Chromoscan 2oo/2o1 von Joyce Loeble
Wellenlänge: λ = 53o nm

5.2.4.4.
Nachweis von Lipoproteinen

Die PA-Gele wurden in einer o,5%igen (w/v) Sudan-Schwarz Lösung in 95%igem EtOH gefärbt und in 5o%igem EtOH differenziert.

Fotografische Dokumentation: Agfa pan 25, Durchlicht

IEP-Gele wurden nach dem Trocknen in einer in gesättigten Ölrot-lösung (6o% EtOH) bei 37°C gefärbt und anschließend mit 5o%igem EtOH entfärbt.

Fotografische Dokumentation: Agfa pan 25, Durchlicht

IEP-Gele wurden nach dem Trocknen in einer in gesättigten Ölrot-lösung (6o% EtOH) bei 37°C gefärbt und anschließend mit 5o%igem EtOH entfärbt.

5.2.4.5.
Nachweis von Phosphoproteinen

Es wurde die Methode von Cutting & Roth (1973) angewandt.

Behandlung der Gele:

1.	Fixierung in 1o% SSA in a.bidest (bis zu 12 h)	
2.	1o% SSC + o,5 M $CaCl_2$	1 h
3.	schnelles und gründliches Waschen in a.d. (oberflächliches $CaCl_2$ stört)	
4.	o,5 N NaOH bei 6o°C	3o min
5.	Waschen in 1% wässriger Ammoniummolybdatlösung	2x 1o min
6.	1% Ammoniummolybdatlösung in 1 N HNO_3	3o min
7.	Färben in o,5% Methylgrün (C.I.4259o) in 7% HAc	3o min
8.	Entfärben in Wechselbädern von 1o% SSC	
9.	Aufbewahren in 7% HAc	

Nachweisgrenze: ca. 1 nmol Phosphat

Für SDS-Gele wurde Punkt 1 wie folgt abgewandelt: mehrmaliges Bäderwechseln zur Entfernung des SDS, Gesamtdauer 24 h

Fotografische Dokumentation: Agfa Pan 25, Durchlicht, Rotfilter

5.3.
"Western Blotting" mit anschließendem Proteinnachweis mittels Antikörper (nach Towbin et al., 1979 und Risau 198o)

Diese Methode ermöglicht es, einzelne Polypeptidbanden in Polyacryamidgelen immunologisch eindeutig zu identifizieren.

Durch die Verwendung der Peroxidase-Reaktion können Proteinmengen bis zu 1oo pg (untere Nachweisgrenze) erfaßt werden (Towbin et al., 1979).

Behandlung der Gele:

1. Auftrennung der Proteine mit SDS-slab-Gelen	
2. Renaturierung der Proteine in Harnstoffpuffer	o,5-1,o h
3. Transfer auf Nitrocellulose in Tris-Glycin-Puffer (3o V, ca. 7oo mA)	3,o h
4. Trocknen der Filter möglichh	
5. Inkubation in PBS mit o,1% BSA und o,o5% Triton 1oo	1,o h
6. Inkubation in PBS mit 3% BSA	3,o h
7. Inkubation mit dem antigen-spezifischen Antikörper in PBS mit o,5% BSA	
Antikörper: Anti-Vg(H),Verdünnung 1:6ooo	ü. N.
8. Waschen in PBS mit o,1% Triton	4x15 min
9. Inkubation Anti-Kaninchen-IgG (aus Schweinen) in PBS mit o,1% BSA	
Verdünnung: 1:1oo	1,o h
1o. Waschen in PBS mit o,1% Triton	4x15 min
11. Inkubation mit PAP (Kaninchen) in PBS mit o,1% BSA	
Verdünnung: 1:1oo	1,5-2,o h
12. Waschen in PBS mit o,1% Triton	4x15 min
13. Enzymreaktion mit	
1 Teil 4-Chloronaphtol (3mg/ml 96% EtOH)	
5 Teile 1oo mM Tris (pH 7,5)	
o,o5% H_2O_2	
14. Stoppen der Farbreaktion in Eiswasser	
15. Fotografieren (Ausbleichgefahr)	
16. Trocknen (gegen zu weitgehendes Ausbleichen)	

Bei nativen Gelen wurde Schritt 1 und Schritt ausgelassen.

5.4.
Peptid-Mapping

Für den Vergleich einzelner Polypeptidbanden, die im vorherigen Test (5.3.) positiv reagierten, wurde das Bandenmuster in SDS-slab-Gelen nach enzymatischem Verdau herangezogen.

Die Auswertung d.h. die Abschätzung über den Grad der möglichen Übereinstimmung wurde nach folgender Formel (nach Calvert & Graber, 1978) durchgeführt:

$$P(x) = \frac{m!n!(N-m)!(N-n)!}{N!x!(m-x)!(n-x)!(N-m-n+x)!}$$

Für $P(x) < 0{,}01$ kann die Möglichkeit einer Übereinstimmung der Polypeptide durch Zufall ausgeschlossen werden.

N = max. Bandenzahl im zu vergleichenden Gelbereich
m = Anzahl der Banden von Probe 1
n = Anzahl der Banden von Probe 2
x = Anzahl der übereinstimmenden Banden

Durchführung der Methode (nach Cleveland et al., 1977):

1. Auftrennung der Proteine über 3-10% SDS-Gradienten-slab-Gele (200 µg Protein/ 1cm Tasche)
2. Fixieren und Färben mit Coomassie Blue R 250 — 30 min
3. Entfärben mit frischer Entfärberlösung — 3x 5 min
4. Waschen in a. bidest (Kühlschrank) — 3x 5 min
5. Ausschneiden der Banden
6. Inkubation in TES-Puffer (500 µl/Bande), gut schütteln — kurz
7. Inkubation in TES/10-Puffer, schütteln — 30 min
8. Gelstücke in die Tasche des vorbereiteten 2. Gels legen und mit 10 µl TES/20-Puffer überschichten
9. Weiteres Überschichten mit 10 µl Trypsinlösung
10. Elektrophoreselauf mit gleichzeitigem Trypsinverdau (30-50 mA/ Gel) — 1,5 h
11. Elektrophoreselauf im Trenngel (50-70 mA) — 1,5 h
12. Silberfärbung

Zusammensetzung des Verdau-Gels:

Sammelgel: 3% Acrylamid, TES-Puffer p_H = 6,8
Länge:5 cm

Trenngel: Mischgel mit 3-2o% Acrylamid im oberen Bereich (ca.8 cm)
und 2o% Acrylamid im unteren Bereich (ca. 2cm)

Trypsinlösungen:
Es wurden o,5%-, 1%- und 2% ige Lösungen in TES-Puffer angewandt.

5.5.
Kombination von Peptid-mapping und Western-Blot mit PAP

Nach Durchführung des Peptid-mapping (5.4.) wurden die ungefärbten Gele in Harnstoff-Puffer renaturiert und das Western-Blotting mit anschließendem PAP-Nachweis, wie unter 5.3. beschrieben, durchgeführt.

6.
Antiseren

6.1.
Herstellung der Antiseren

6.1.1.
Antiserum gegen die Proteine der Arbeiterinnenhämolymphe

Den Kaninchen wurde im Abstand von 14d, 8d, 8d, 8d eine Mischung aus kompletten (1.Injektion) bzw. inkompleten (alle weiteren Injektionen) Freundschem Adjuvans und einem Arbeiterinnen-Hämolymphpool (Alter: od, Ammen, 3od im Verhältnis 1:3:1) subkutan injiziert. Es wurde dabei laufend der steigende Ak-Titer des Blutes mit der eindimensionalen Immundiffusion nach Mancini kontrolliert.

Eine Woche nach der letzten Boosterung wurde dann aus der Ohrvene der Tiere ausreichend Blut entnommen. Nach der Gerinnung bei 37°C und dem Sichzusammenziehens des Blutkuchens über Nacht bei 4°C wurde das klare Serum dekantiert und evtl. noch vorhandene Blutzellen abzentrifugiert. Aliquots des Serums wurden bei -2o°C gelagert.

6.1.2.
Antiserum gegen die Hämolymphproteine der Drohnen

Es wurde hierbei entsprechend 6.1.1. verfahren. Der Hämolymphpool setzte sich aus je 20 µl Hämolymphe o-3d, 5d und 19d alter Drohnen zusammen.

6.1.3.
Vergleichsseren

Aus institutseigenen Beständen standen mir außerdem Seren gegen Eihomogenat und den Proteinfraktionen H1 und H3b (vgl. Kaatz,1980 und Trenczek, 1979) zur Verfügung.

6.1.4.
Antiseren gegen Vitellogenin

Für die Herstellung eines monospezifischen Antiserums gegen das Vitellogenin der Bienen wurden zwei verschiedene Wege beschritten.

6.1.4.1.
Die Reinigung des Vitellogenins erfolgte mit zweimaliger präparativer (3mm Geldicke) SDS-PAGE. Die ausgeschnittene Vitellogeninbande wurde unter Zugabe von 0.9%ger NaCl-Lösung und Freundschem Adjuvans in gegeneinander zusammengesteckten 1ml-Spritzen homogenisiert un den Kaninchen subkutan injiziert (vgl.Kaatz, in Vorbereitung

6.1.4.2.
Die zweite Reinigung erfolgte über eine präparative line-Immun-Elektrophorese nach Krøll & Anderson (1976).
Die präparative IEP wurde mit 3mm dicken 1%igen Agarosegelen (Ak-Gehalt 2%) in Minielektrophoresekammern durchgeführt. Zur Präzipitation des Vitellogenins wurde das Anti H3b-Serum , das zuvor mit Hämolymphe frisch geschlüpfter Arbeiterinnen titriert wurde, verwendet. Nach beendetem Elektrophoreselauf wurden die Gele 3 Tage mit o,9%iger NaCl-Lösung gewaschen, die Banden aus geschnitten,

mit Freundschem Adjuvanz homogenisiert und den Kaninchen subkutan injiziert bzw. in SDS-Probenpuffer aufgekocht und mittels PA-Gelen auf ihre Reinheit getestet.
Dieses Serum wurde mit Anti-Vg(T) bezeichnet.

Für die folgenden immunologischen Untersuchungen, sowie für den PAP-Test wurde ausschließlich das Anti-Vg(H)-Serum eingesetzt.

6.2.
Immunologische Untersuchungen

Alle IEPn wurden mit folgenden Grundbedingungen durchgeführt:

- 1% Agarose in o,o6M Tris-Puffer (pH 8,6)
- Elektrophoresepuffer: o,3M Tris-Puffer (pH 8,6)
- Feldstärke: 1. Dim. (ohne Ak): 8 V/cm
  2. Dim. (mit Ak): 2,5 V/cm (bzw. eindim. Gele)
- Elektrophoresedauer: 1. Dim. : 45 min
  2. Dim. : 15-18 h (bzw. eindim. Gele)

- Aufarbeitung der Gele: Pressen 3o min
  Waschen 24 h in o,9% NaCl
  Pressen 1 h
  Waschen 3o min in a.bidest
  Pressen 1 h
  Trocknen bei 6o°C
  Färben mit Coomassie Blue R25o bzw. Ölrot

6.2.1.
2-dimensionale Immunelektrophorese (einfach und Tandem-Typ)

Diese Methode wurde zur Reinheitsprüfung der gewonnenen Antiseren sowie zur qualitativen Charkterisierung der Hämolymphproteine von Arbeiterinnen und Drohnen verwendet.

6.2.2.
Line-Immunelektrophorese

Diese Methode wurde sowohl für den Vergleich der verschiedenen Seren als auch der unterschiedlichen Ag-Zusammensetzung der Hämolymphen neben den Untersuchungen in PA-Gelen benutzt. Es wurden 2 verschiedene Testsysteme eingesetzt.

6.2.3.
Quantitative Immunelektrophorese

Sie wurde zur Bestimmung des Vitellogeningehaltes der Hämolymphe einzelner Tiere herangezogen.
Als Standard diente über native Gele isoliertes Vitellogenin, das in o,o6 M Tris-Puffer (pH 8,6) aufgenommen wurde.

7.
Säulenchromatographie

7.1.
Proteintrennung über Anionenaustauscher

Es wurde das FPLC-System der Fa. Pharmacia mit der Säule Mono Q (Partikelgröße lo µm ± 2%) verwendet. Diese Säule besitzt eine höhere Kapazität für hochmolekulare Proteine als herkömmliche Ionenaustauscher z.B. Sepharose CL6B (Dubbel, 1982).

Für die Trennung wurde 15o µl Hämolymphe in 3oo µl 5o mM Tris/HCl und o,1 M NaCl (pH 8,1) aufgenommen, Zellbestandteile abzentrifugiert und der gesamte Überstand auf die Säule aufgetragen. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug o,5 ml/min und es wurde bei 4°C gearbeitet. Die Extinktion der eluierten Proteine wurde kontiniuerlich bei einer Wellenlänge von 28o nm gemessen und Fraktionen von o,5 ml gesammelt.
Die erste Elution erfolgte mit oben genannten Puffer und anschließend mit einem Gradienten von o,1 M - 1,o M NaCl in Tris/HCl (pH 8,1).

Je 20 µl je Fraktion wurde mit 10 µl SDS-Probenpuffer aufgekocht und über SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung charakterisiert.

7.2.

Molekulargewichtsbestimmung über Molekularsiebsäulen

Die über die Mono Q-Säule erhaltene Vitellogenin-Fraktion wurde über eine geeichte Molekularsiebsäule von LKB (Typ: TSK 4000) aufgetragen und mit Tris-Puffer pH 7,5 bei 1 ml/min eluiert. Die Fraktionen à 250 µl wurden anschließend auf einem 7,5%igen 0,75 mm SDS-PA-Gel untersucht.

Ergebnisse

1.
Diploide Drohnen

1.1.
Volle künstliche Aufzucht

In keiner der so angesetzten Testserien konnte eine Bienenlarve bis zum Imaginalschlupf gehalten werden. Der kritische Zeitpunkt lag bei Beginn der Streckmaden-Vorpuppenphase.

1.2.
Halb-künstliche Aufzucht

Diese Serien konnten sowohl in Warschau/Polen wie auch in Tübingen mit Erfolg durchgeführt werden.
Beeinflußt wurde dieses Verfahren entscheidend durch das Verhalten der Pflegevölker. So konnten bei einem Schlechtwettereinbruch Kannibalismusraten bis zu loo% auftreten.
Bis zu einem gewissen Grad hatten auch die verwendeten Diäten Einfluß auf den Aufzuchterfolg. Die erfolgreichsten Diäten waren: frisch gesammeltes Gelée royale (Diät 2) und leicht modifizierte Diäten nach Rembold et al. (1974) (Diät 7 und 8). Alle übrigen Futteransätze führten zu hohen Sterblichkeitsraten bis hin zum Absterben der Larven schon wenige Stunden nach dem Umlarven.
Bei einem Teil der Serien trat auch Kalkbrut auf.

Es konnten insgeamt 14 diploide Drohnen aufgezogen werden. Davon wurden 12 Tiere den biochemischen Untersuchungen unterworfen.
Der durchschnittliche Aufzuchterfolg schwankte zwischen 5 und 43%. Ein Vergleich zwischen den in Polen (67%) und hier am Institut durchgeführten Serien (77%) am dritten Aufzuchttag weist auf eine Verbesserung der Arbeitsweise hin.

2.
Biometrische Daten

2.1.
Gewicht

Die diploiden Drohnen hatten ± 12 h nach dem Schlupf ein Gewicht von 269,6 ± 23,7 mg gegenüber den haploiden Geschwisterdrohnen mit 261,7 ± 15,8 mg. Im Alter von 5-6 d vergrößerte sich der Gewichtsunterschied zwischen diploiden und haploiden Drohnen erheblich. Die Differenz betrug 43,1 mg.
Frisch geschlüpfte Drohnen unbekannter Herkunft wogen im Mittel 253,6 ± 26,4 mg (Abb.38 im Anhang und Tab.9).
Gleichzeitig durchgeführte Messungen an haploiden Drohnen von weisellosen Arbeiterinnen, die ihre Eier in Arbeiterinnenzellen gelegt hatten, ergaben ein mittleres Gewicht von 17o,9 ± 14,9 mg.

2.2.
Flügel-Häkchenzahl

Da die Häkchenzahl zwischen rechten und linken Hinterflügeln oft differierte, wurde zur Auswertung der Mittelwert beider Flügel verwendet.
Diploide Drohnen haben im Vergleich sowohl zu den haploiden Drohnen derselben Mutterkönigin als auch zu haploiden Drohnen unbekannter Herkunft eine signifikant erniedrigte Häkchenzahl ($P \leq o,o1$).

diploide ♂♂ (V82):	19,3 ± 2,5	(n = 14)
haploide ♂♂ (V82):	22,5 ± 1,8	(n = 15)
haploide ♂♂ (Herkunft ?)	22,8 ± 2,1	(n = 31)

Der Vergleich der Häkchenzahl von Arbeiterinnen unbekannter Herkunft und Arbeiterinnen der Inzuchtserien (V82) zeigt dagegen kein signifikanten Unterschied.

♀♀ (Herkunft ?)	21,4 ± 1,4	(n = 30)
♀♀ (Herkunft ?)	21,9 ± 1,9	(n = 21)
♀♀ (V82)	21,4 ± 1,o	(n = 2o)

2.3.

Testes und Spermien

Die Testes eintägiger diploider Drohnen sind gegenüber denen haploider Drohnen deutlich kleiner.

Abb.1:
(a) Seiten- und (b) Dorsalansicht eines diploiden Drohns (Alter 1d).

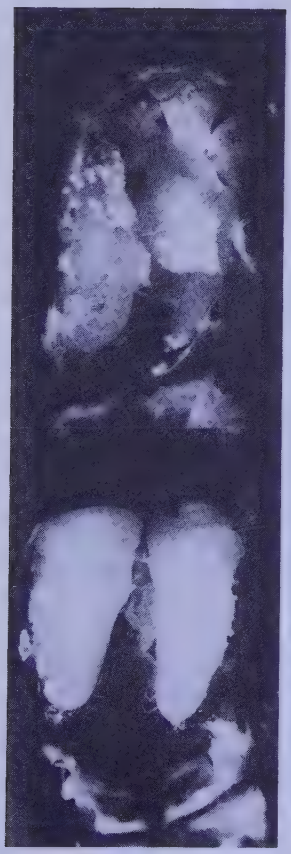
Abb.2:
Dorsalansicht der inneren abdominalen Organe eines diploiden (a) und haploiden (b) Drohns (Alter:1d), Vergr.: 16x

1 paarige Testes	7 Fettkörperzellen
2 Mucus-Drüse	8 Herz
3 Samenblase	9 Reste der Tracheensäcke
4 Mitteldarm	1o abdominale Sternite
5 Malpighische Gefäße	11 abdominale Tergite
6 Rectum	12 Tracheen

Abb.3:
Phasenkontrast-Aufnahme eines Bienen-Spermiums (haploider Drohn), Vergrößerung.:looox (Öl).

Abb.: 1

Abb.: 2



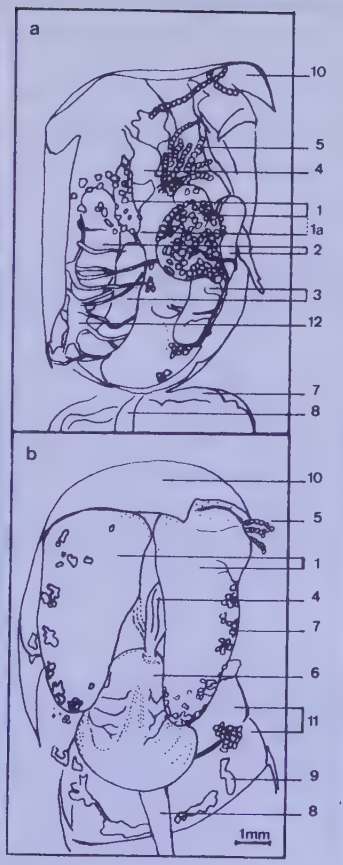


Abb.: 3

5µm

2.4.
DNS-Gehalt der Spermien

Die Extinktion (in AE) der Spermienkerne diploider Drohnen ist durchschnittlich um den Faktor o,68/o,32 = 2,1 höher als der haploider Drohnen (s.Tab.8 und Abb.4).
Im metrischen System ausgedrückt beträgt der DNS-Gehalt haploider Spermien näherungsweise o,14 pg/C und der diploider Spermien o,29 pg/2C.

Referenzwerte sind für die Hühnererythrozytenkerne nach Rasch et al. (1971) und Davidson et al. (195o) 2,5 pg/C sowie nach Mirsky & Ris (1951) 2,34 pg/C.

Zur Auswertung der biochemischen Analysen siehe unter 4.7..

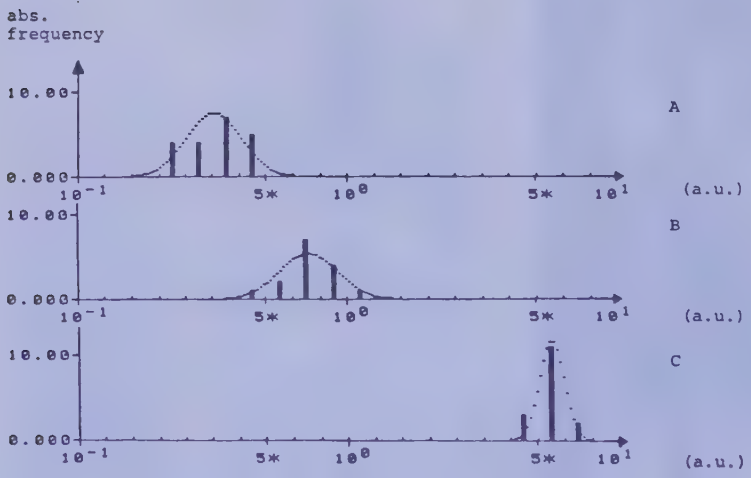


Abb.4:
DNS-Gehalt der Spermien haploider und diploider Drohnen durch photometrische Bestimmung nach Feulgen-Färbung bei λ = 56o nm.
A = haploider Drohn (6d): x= o,318 a.u. (= o,14 pg/C)
B = diploider Drohn (5d): x= o,717 a.u. (= o,31 pg/2C)
C = Hühner-Erythrocyten: x= 5,634 a.u. (= 2,34 pg/2C)

3.
Qualitative Proteinanalysen

3.1.
Charakterisierung der Hämolymphproteine mit nativer PAGE

Ein Vergleich der unter nativen Bedingungen mit PAGE aufgetrennten Hämolymphproteine (Abb.5:1-3) mit Ei- und Ovarhomogenaten (Abb.5:4+5) zeigt, daß eine starke Proteinfraktion der Ammenbienen ähnliche elektrophoretische Eigenschaften aufweist wie die Hauptfraktion des Ei- und Ovarhomogenats. In der Hämolymphe frisch geschlüpfter Drohnen und Arbeiterinnen fehlt diese Fraktion.
Diese Fraktion weist bei der Auftrennung mit Acrylamidkonzentrationen zwischen 3 und 12,5% starke Schwankungen bzgl. ihres Rf-Wertes. Je höher die gewählte Acrylamid-Konzentration gewählt wurde, umso näher lag sie dem als Marker eingesetzten Enzym Katalase mit 24o K. Versuche mit der "pore-limited" Gel-Elektrophorese nach Hedrick & Smith (1968, Acrylamidkonzentraytion 5-3o% und 12ooo Vh) ergaben für die unter diesen Bedingungen noch stärker zurückgehaltene Proteinfraktion ein Molekulargewicht im Bereich von 21o-24o K.

Die noch höhermolekularen Fraktionen zeigen bzgl. des Alters und des Geschlechtes der Bienen ebenfalls sehr starke Schwankungen in ihren Rf-Werten.

Spezifische Färbemethoden (Abb.6) ergaben, daß die langsam laufende Fraktion Phospho-, Kohlenhydrat- und Lipidanteile enthält. Die Hauptfraktion des Ei- bzw. Ovarhomogenates sowie die ähnlich laufende Fraktion der Ammenhämolymphe reagieren schwach PAS-positiv. Dagegen fällt bei ihr die Reaktion mit Methylgrün auf Phosphat-Anteile deutlich aus.

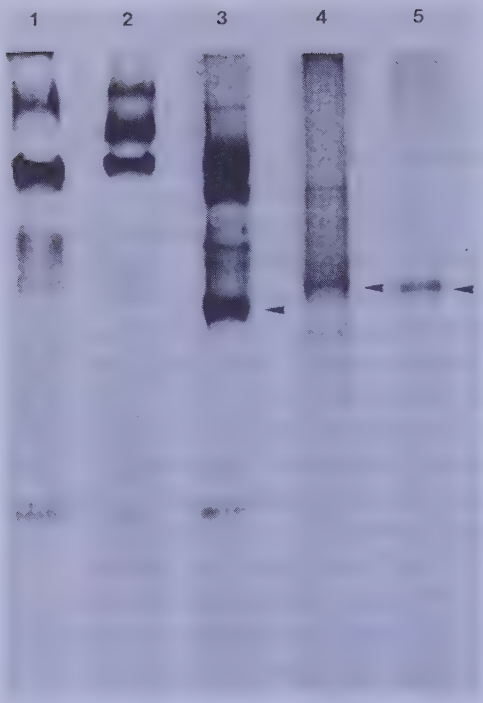


Abb.5:
Auftrennung von Bienen-Proteinen mit nativer PAGE (5-12,5%), Färbung mit Coomassie Blue R 25o.
1 = Drohnen-Hämolymphe (od)
2 = Arbeiterinnen-Häm. (od)
3 = Ammenhämolymphe (7d)
4 = Ovarhomogenat (Königin)
5 = Eihomogenat
Die Vitellogenin resp. Vitellin-Fraktion ist durch ► gekennzeichnet.

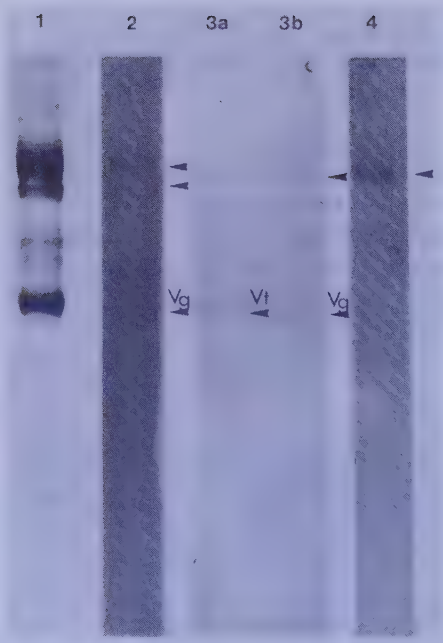


Abb.6:
Spezifische Färbungen nach Auftrennung der Proteine mit nativer PAGE (5-12,5%):
1 = Übersichts-Färbung mit Coomassie Blue R 25o
2 = PAS-Färbung auf Kohlenhydratreste
3 = Methylgrünfäbung für Phospho-Proteine
a = Eihomogenat
b = Ammenhämolymphe
4 = Sudan-Schwarz-Färbung für Lipo-Proteine
1,2 und 4 sind Proteine der Ammenhämolymphe
Vg = Vitellogenin-Fraktion

3.2.
Allgemeine Charakterisierung der Hämolymph-Proteine mit SDS-PAGE

Im Grundmuster der Hämolymph-Proteine auf SDS-Polyacrylamid-Gelen fallen die Banden Vg, a, b, c, e und f auf. Diese Polypeptide treten nur bei Arbeiterinnen im Ammenalter und Königinnen sowie bei weisellosen Arbeiterinnen auf. Zu diesen Banden weisen Ei- und Ovarhomogenat Polypeptide mit gleichen elektrophoretischen Eigenschaften auf (Abb.7+8).
Von diesen als weibchenspezifisch zu bezeichnenden Banden ist das Polypeptid Vg mit 18o K das weitaus prominenteste. Gegen dieses Polypeptid wurde das Serum Anti-Vg(H) gewonnen (vgl.II.6.1.4. und III.3.4.1.). Mit Hilfe dieses Serums konnte die immunologische Identität zwischen den Banden mit 18o K der Arbeiterinnen, Königinnen, Ei- und Ovar- sowie Fettkörperhomogenat bewiesen werden (vgl.Abb.2o). Das 18o K Polypeptid kann daher als das Vitellogenin resp. bei Ei- und Ovarhomogenat als Vitellin der Bienen bezeichnet werden.

Es fallen auch Unterschiede zwischen Arbeiterinnen und Königinnen auf. Das Polypeptid a (145 K) ist bei den Arbeiterinnen relativ stärker vertreten als bei den Königinnen und Arbeiterinnen aus weisellosen Völkern. Weiterhin ist das Peptid e (48K) bei Königinnen und das Peptid f (43 K) bei Arbeiterinnen deutlicher zu erkennen (Abb.7).

Außer dem Vitellogenin bestehen zwischen Ei-, Ovar, und Fettkörperhomogenat Übereinstimmungen aufgrund gleicher elektrophoretischer Eigenschaften zwischen den mit ▷ gekennzeichneten Polypeptid-Banden.

Die meisten Hämolymph-Proteine haben einen mehr oder weniger hohen Anteil an Kohlenhydrat-Komponenten (Abb.8a und b, vgl. Abb.6).
Mit der Methylgrünfäbung konnte wie bei den nativen PA-Gelen gezeigt werden, daß Vitellogenin ein Phospho-Protein ist (Abb.8c).

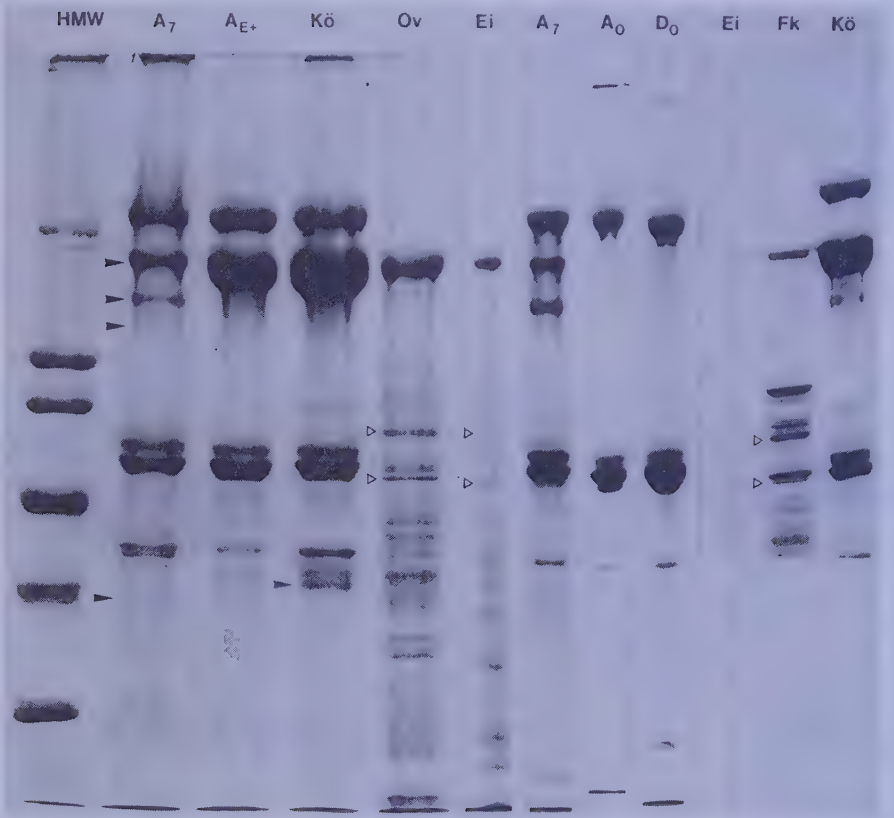


Abb.: 7

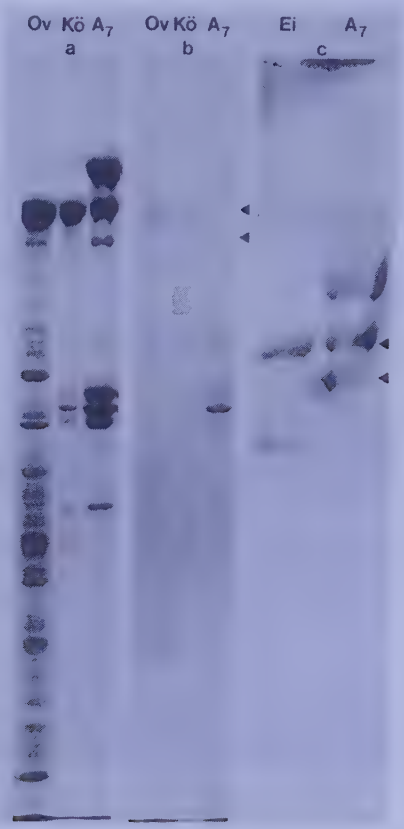


Abb.: 8

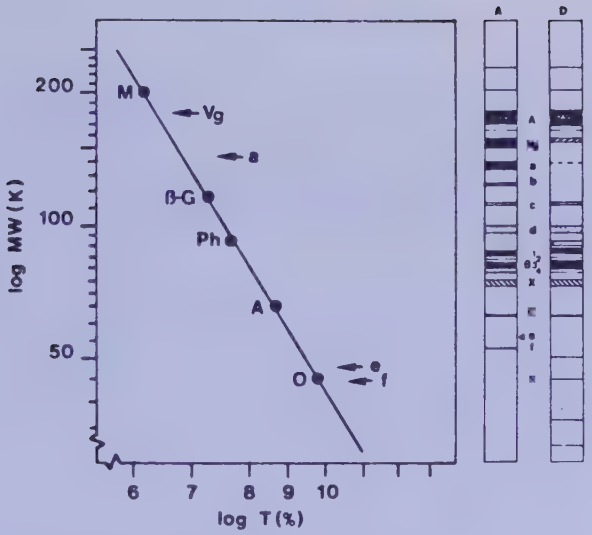


Abb.9:
Molekulargewichts-Bestimmung nach Lambin (1978) mittels SDS-PAGE:
Molekulargewichts-Marker: M = Myosin (2oo K), ßG = ß-Galaktosidase (116 K), Ph = Phosphorylase b (92 K), A = BSA (66/68 K), O = Ovalbumin (45 K).
Vg, a, e und f = weibchen-spezifische Peptide (siehe Text)
T = Acrylamid-Konzentration, MW (K) = Molekulargewicht in K

A und D = Schemata der Hämolymph-Proteine von Arbeiterinnen (A) und Drohnen (D).

Abb.7:
Muster der löslichen Bienen-Proteine nach Auftrennung mit SDS-PAGE:
A7 = Ammen-Hämolymphe
Ao = Hämolymphe frisch geschlüpfter Arbeiterinnen
A_{E+}= Hämolymphe weiselloser Arbeiterinnen
Kö = Königinnen-Hämolymphe
Ov = Ovarhomogenat
Ei = Eihomogenat
Fk = Fettkörperhomogenat
Do = Hämolymphe frisch geschlüpfter Drohnen
HMW = Molekulargewichts-Marker (45-2oo K)
Die weibchen-spezifischen ProteineVg, a, b, e und f (s. Text) sind durch ► gekennzeichnet.
Typische nur in Fettkörper-, Ei- und Ovarhomogenat auftretende Proteine sind durch ▷ ausgewiesen.

Abb.8:
Nachweis von Glyko- und Phosphat-Proteinen nach Auftrennung der Proteine mit SDS-PAGE (5-12,5%):
Kennzeichnung der Proben wie in Abb.7.
(a) Coomassie Blue R 25o zur Übersichts-Färbung
(b) PAS-Färbung für Glyko-Proteine
(c) Methylgrün-Färbung für Phospho-Proteine

Mit 2-dimensionalen Geltechniken wurde der Versuch unternommen, die Polypeptide der SDS-PA-Gele den Fraktionen auf nativen PA-Gelen zuzuordnen. Aus der nativen Fraktion des Eihomogenats ergeben sich unter den denaturierenden Bedingungen von SDS die Polypeptide Vg (18o K) und a (145 K) (Abb.lob). Bei der Auftrennung von Ammenhämolymphe entstehen aus der nativen weibchen-spezifischen Fraktion ebenfalls die Polypeptide Vg, a und b in Spuren (Abb.loa).

Das Vitellogenin von APIS ist den Ergebnissen zufolge ein Phosphoglyko-Protein. Der nativen Vitellogenin-Fraktion lassen sich die weibchen-spezifischen Polypeptide Vg, a, b, e und f zuordnen, wobei das Peptid Vg (18o K) als das Vitellogenin unter denaturierenden Bedingungen anzusprechen ist.

Abb.10:
Charakterisierung der Bienen-Proteine mit 2-dimensionaler nativ/SDS-PAGE nach Färbung mit Coomassie Blue R 25o.
Die Auftrennung der Proteine in der 1. Dimension über native PAGE ist durch die waagrecht angeordneten Gelstreifen dargestellt, die Vitellogenin-Fraktion durch ▽ gekennzeichnet.

(a) Ammen-Hämolymphe
(b) Eihomogenat
(c) Hämolymphe frisch geschlüpfter Arbeiterinnen
(d) Hämolymphe 5d alter Drohnen

Die weibchen-spezifischen Polypeptide Vg, a und e sind mit ► markiert.

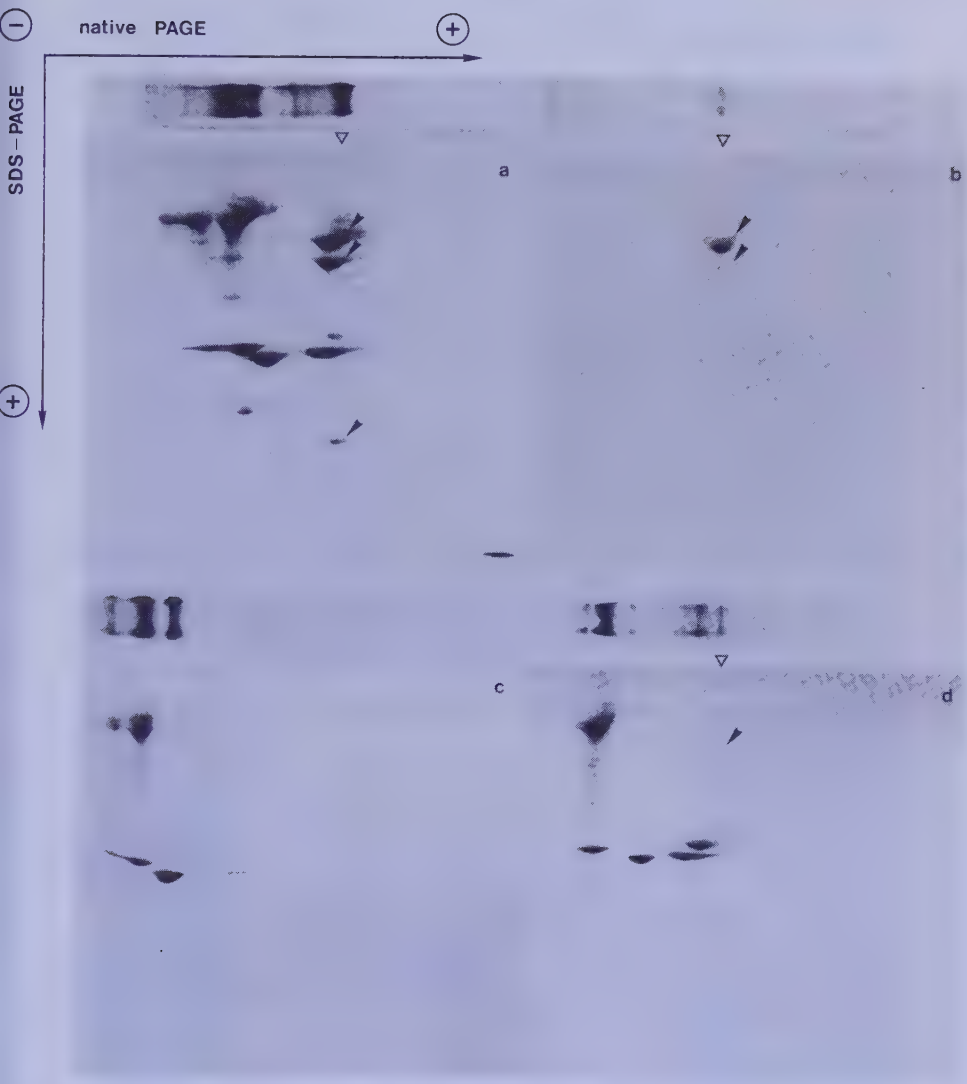


Abb.10

3.3.
Proteine der Drohnen

3.3.1.
Übersicht

Es sollte untersucht werden, ob das bisher allgemein beschriebene Fehlen des Vitellogenins in der Drohnen-Hämolymphe wie bei Männchen anderer Insekten-Arten durch Hormon-Applikationen aufgehoben werden kann.

Ein Versuch, imaginale Drohnen nach physiologischen Kriterien und nicht nach ihrem Alter zu charakterisieren, war die Auftrennung der lösliche Proteine von Hoden und Samenblase (Abb.13).
Bis zum vierten imaginalen Lebenstag zeigten sich keine gravierenden Veränderungen im Protein-Muster. Danach konnten 4 Polypeptide in der Samenblase der Drohnen wiedergefunden werden, die zu diesem Zeitpunkt aus dem Muster der Hodenproteine verschwanden.

Da diese Untersuchungen aber einen zu hohen Zeitaufwand mit sich brachten, wurde die Charakterisierung der Drohnen nach dem Alter beibehalten.

Abb.11:
Typisches Muster der löslichen Hämolymph-Proteine der Drohnen nach Auftrennung über SDS-PAGE (5-12,5%) mit Coomassie Blue R 25o-Färbung: Die Ziffern geben das Alter der Drohnen in Tagen nach dem Schlupf an. Es wurden stets Einzeltier-Proben aufgetragen. Als Referenz-Proben diente A7 = Ammenhämolymphe, Ei = Eihomogenat, M = Molekulargewichtsmarker (45-2oo K), ▷ = Vitellogenin.

Abb.12:
Protein-Analyse über native PAGE (5-12,5%) von D1o = Hämolymphe eines 1o d alten Drohns, A7 = Ammenhämolymphe.
Die native Vitellogenin-Fraktion ist durch ▷ gekennzeichnet.

Abb.13:
Vergleich der löslichen Proteine von Homogenaten der Samenblase (S) und der Hoden (T). Die Ziffern bezeichnen das Alter der Tiere in Tagen. Die mit ▷ markierten Banden treten bei jungen Drohnen nur im Hoden, später nur in der Samenblase auf (siehe Text).

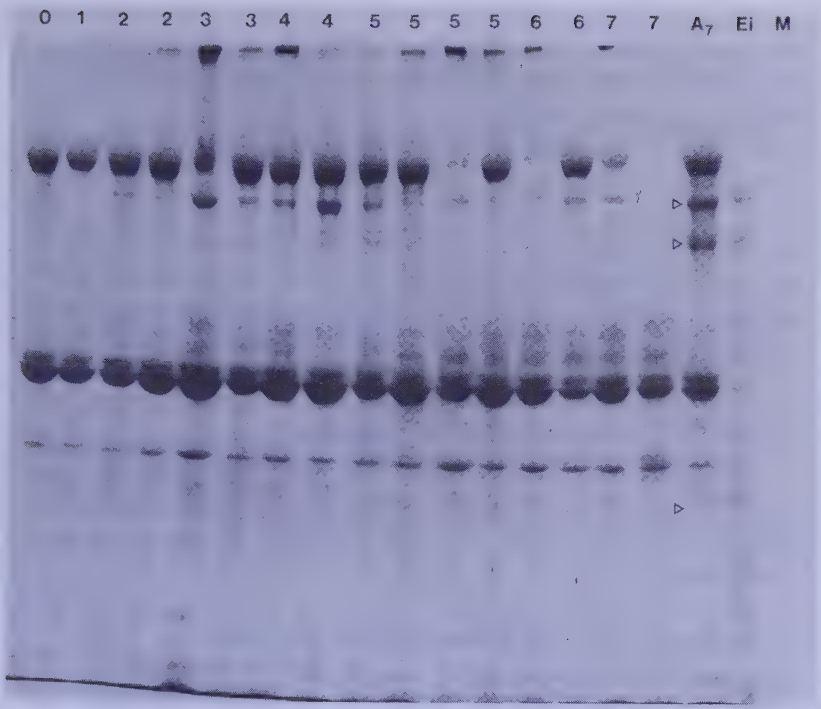


Abb.:11

Abb.:12

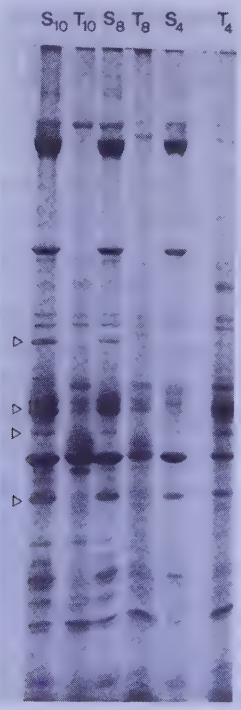


Abb.:13

Als Ausgangsbasis für die Versuche mit Hormon-Applikation wurden zuerst die unter normalen Bedingungen vorkommenden Hämolymph-Proteine der Drohnen genauer charakterisiert (Abb.11).
Außer dem schon beschriebenen Grundmuster (vgl.Abb.8) sind folgende Veränderungen im Verlauf der Imaginalphase zu erkennen:

Mit zunehmenden Alter treten 2 diffuse kohlenhydrathaltige Banden mit einem Molekulargewicht von 92 und ca. 85 K auf (Abb.9+11). Das Polypeptid A scheint besonders bei Drohnen, die über 1o d alt sind, starken Titerschwankungen mit der Tendenz zu einem geringeren Anteil an den löslichen Hämolymph-Proteinen unterworfen zu sein.

3.3.2.
Vitellogenin

Ab dem zweiten imaginalen Lebenstag zeigen die Drohnen in ihrem Hämolymphprotein-Spektrum eine Bande von 18o K. Hin und wieder konnte auch ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 145 K beobachtet werden.

Native PAGE von 5-12 d alten Drohnen zeigten ebenfalls eine Proteinfraktion, deren Rf-Wert dem der Vitellogenin-Fraktion der Ammenbienen entsprach (Abb.12).
Ebenso trat bei der Aufarbeitung mit Hilfe der 2-dimensionalen PAGE-Technik an der Stelle, wo man das Vitellogenin erwarten würde, ein kleiner Protein-spot auf (Abb.1od).

Native PAGE, SDS-PAGE und 2-dimensionale PAGE zeigten übereinstimmend das Auftreten eines in Molekulargewicht und elektrophoretischem Verhalten dem Vitellogenin der Weibchen entsprechendes Protein in der Hämolymphe der Drohnen.
Es galt nun mit anderen Methoden die Annahme zu beweisen, daß das 18o K Polypeptid der Drohnen Vitellogenin ist. Dieses Problem wurde mit verschiedenen immunologischen Methoden angegangen.

3.4.
Serentestung

Die gegen Vitellogenin erhaltenen Seren wurden mit 2-dimensionaler IEP auf ihre Reinheit getestet.

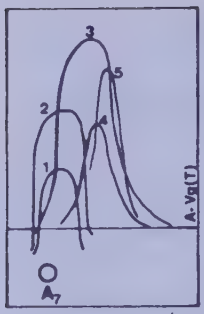
3.4.1.
Anti-Vg(H)-Serum

Das mit Anti-Vg(H) bezeichnete Serum zeigte gegen das vollständige Antigen-Gemisch der Ammenhämolymphe nur einen Präzipitations-Peak (Abb.14a). Er hatte die gleiche Lage wie der weibchenspezifische Peak im parallel dazu durchgeführten Test zwischen Ammenhämolymphe und dem Anti-Arbeiterinnen-Hämolymph-Serum (Abb.18a). Bei der Tandem-IEP entstand eine Konfluenz zwischen dem Peak des Eihomogenates und dem der Ammenhämolymphe, ein Zeichen der Homologie der beiden Antigene (Abb.14b).

Für die später durchgeführten empfindlicheren Immuntechniken mußte jedoch auch das Anti-Vg(H)-Serum durch Titration mit Hämolymphe von Drohnen und Arbeiterinnen (Alter 2 und 3od) gereinigt werden. Dieses Serum konnte als monospezifisch bezeichnet werden.

3.4.2.
Anti-Vg(T)-Serum

Das Serum wies bei der 2-dimensionalen IEP fünf Präzipitationsbögen auf (Abb.16). Durch Titrationen und Kreuztests mit verschiedenen Antigen-Gemischen konnte der Vitellogenin-Präzipitationsbogen eindeutig bestimmt werden (Abb.17 a u. b). Es gelang jedoch auch durch mehrfache Titration nicht, die Präzipitation der Peaks No. 4 und 5 zu verhindern (Tab.2).
Dieses Serum wurde für die weiteren Untersuchungen nicht mehr verwendet.



Charakterisierung des Anti-Vg(T)-Serum

	untitriertes Serum					titrierte Seren gegen A_o		gegen D_o			
	Ag: Hämolymphe von										
Peak	A_7	A_o	Ei	Vg	D_5	A_7	A_o	A_7	A_o	D_5	D_o
1	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-
4	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
5	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

Tab.2:
Charakterisierung des Anti-Vg(T)-Serums mit verschiedenen Antigen-Gemischen:
A7 = Ammenhämolymphe
Ao = Hämolymphe frisch geschlüpfter Arbeiterinnen
Ei = Eihomogenat
Vg = isoliertes Vitellogenin
Do = Hämolymphe frisch geschlüpfter Drohnen
D5 = Hämolymphe von 5 d alten Drohnen
Peak 3 kann als Vitellogenin-Präzipitations-Bogen charakterisiert werden.

Abb.14:
Reinheits-Testung des Anti-Vg(H)-Serums.
(a) Tandem-IEP mit Hämolymphe von Ammen (A7) und frisch geschlüpften Arbeiterinnen (Ao).
(b) Tandem IEP mit Ammenhämolymphe und Eihomogenat.
Das Auftreten nur eines Präzipitations-Peaks gegen das Antigen-Gemisch der Arbeiterinnen-Hämolymphe und die Konfluenz mit dem Eihomogenat weist die Spezifität des Serums gegen Vitellogenin und Vitellin aus. Vitellogenin und Vitellin sind immunologisch identisch.

Abb.15:
Präparative Line-IEP nach Krøll & Anderson (1976).
Das 3mm dicke Agarose-Gel war mit 2% (v/v) Anti-H3b-Serum imprägniert. Im Rinnen-Reservoir befand sich Ammen-Hämolymphe (A7) in Agarose gelöst. Als Referenz-Proben dienten Ei-Homogenat (Ei) und Anti-Ei-Serum. Die Präzipitations-linie innerhalb des umrahmten Feldes wurde für die Immunisierung der Kaninchen aufbereitet (siehe Text II.6.1.4.2.).

Abb.16:
Überprüfung des Anti-Vg(T)-Serums mit 2-dim.-IEP. Als Antigen-Gemisch wurde Ammenhämolymphe (A7) eingesetzt, (P=Puffer).
Die 5 Präzipitations-Bögen wurden mit Kreuz-Tests charakterisiert (vgl. Abb.17 und Tab.2).

Abb.17:
Identifizierung einzelner Präzipitations-Bögen des Anti-Vg(T)-Serums:
(a) 2-dim.-IEP mit Zwischengel (imprägniert mit Anti-Vg(H)-Serum. Durch die durchgängige Präzipitationslinie (►) kann derBogen 3 als Vitellogenin-Peak identifiziert werden.
(b) Tandem-IEP mit Hämolymphe von Ammen (A7) und Od alten Arbeiterinnen (Ao)

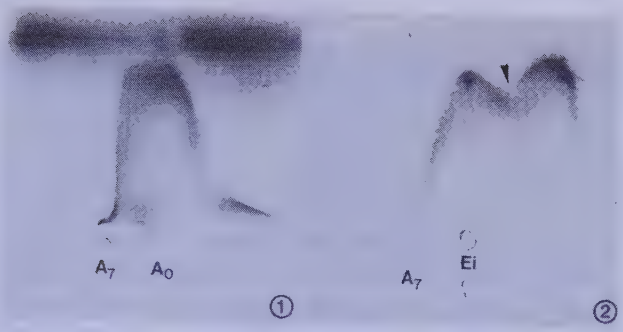


Abb.:14

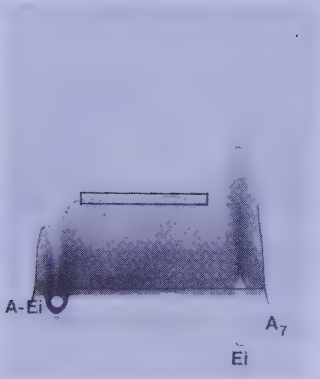


Abb.:15

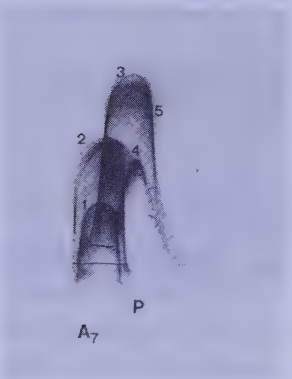


Abb.:16

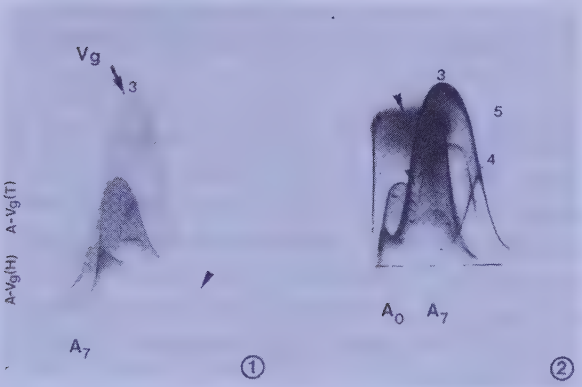


Abb.:17

3.5.
Immunologischer Nachweis des Vitellogenins in der Drohnenhämolymphe

3.5.1.
2-dimensionale IEP

Vergleichsmuster, die mit 2-dimensionaler IEP erstellt wurden, zeigten bei Einsatz von Anti-Arbeiterinnenhämolymph-Serum gegen Ei- und Ovarhomogenat sowie Ammenhämolymphe einen weibchenspezifischen Peak (Abb. 18a,b,c). Die Lage dieses Peaks entspricht dem Vitellogeninpeak bei Verwendung des Anti-Vg(H)-Serums gegen Ammenhämolymphe (Abb.14a). Die Identität dieser Peaks konnte durch 2-dimensionale Tandem-IEP gezeigt werden (Abb.19 a und b).

3.5.2.
"Western-Blotting" mit anschließendem PAP-gekoppelten Immun-Nachweis

Die Auftrennung der löslichen Hämolymphproteine der Drohnen in SDS-PA-Gelen und anschließenden Transfer auf Nitrocellulose-Filter ermöglichte, es einzelne Banden immunologisch zu identifizieren.

Auf das eingesetzte Anti-Vg(H)-Serum wiesen max. 4 Banden eine positive Reaktion. Es waren die Banden Vg, a, b und f (Abb.2ob u. c). Die stärkste Reaktion zeigte die Vitellogenin-Bande. Die Bande b reagierte stärker als die Banden a und f. Diese mehrfache Immunantwort konnte durch kein weiteres Titrieren des Serums verhindert werden.

Sowohl bei den Hämolymphproteinen der Drohnen als auch beim Ei- und Fettkörper-Homogenat reagierte das 18o Kd Polypeptid auf die durch Antikörper vermittelte PAP-Reaktion positiv (Abb.2o). Die Proben von frisch geschlüpften Drohnen und Arbeiterinnen zeigten unter normalen Versuchsbedingungen keine Reaktion. Ein Einstz höherer Hämolymphmengen (15 µl), das entspricht ca. der 3-fachen Gesamtproteinmenge der normalen Bedingungen, ergab aber auch hier bei 18o K eine positive Reaktion.

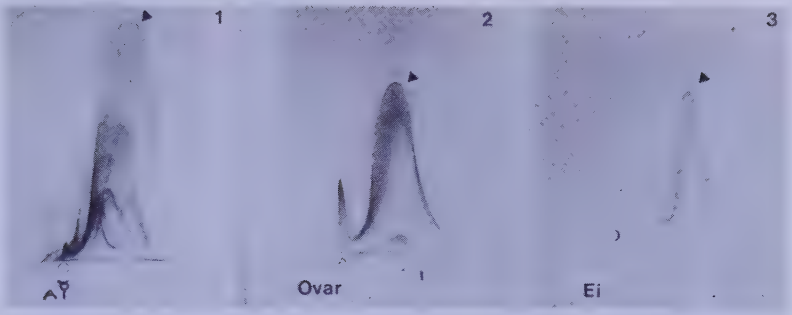


Abb.: 18

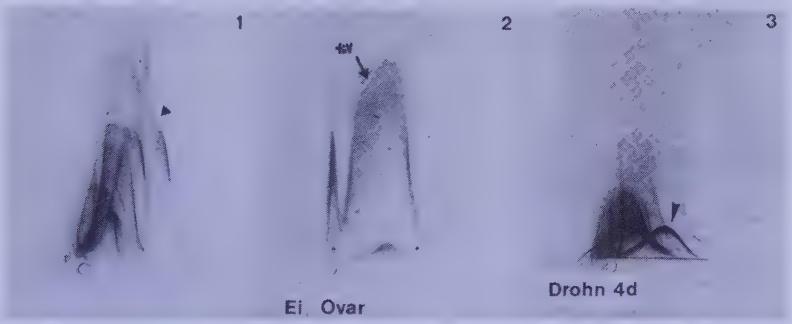


Abb.: 19

Abb.18 und 19:
Charakterisierung des Vitellogenins mit 2-dim.IEP:
Anti-Serum: Anti-Arbeiterinnen-Hämolymph-Serum
Antigene: A7 = Ammenhämolymphe
Ovar = Ovar-Homogenat einer eierlegenden Königin
Ei = Eihomogenat
D4 = Hämolymphe eines 4 d alten Drohns

Abb.18: einfache 2-dim.-IEP, der Vitellogenin-Peak ist mit ▶ gekennzeichnet.
Abb.19: Tandem-IEP, die durch ▶ markierte Konfluenz weist eindeutig den Vitellogenin-Peak aus.

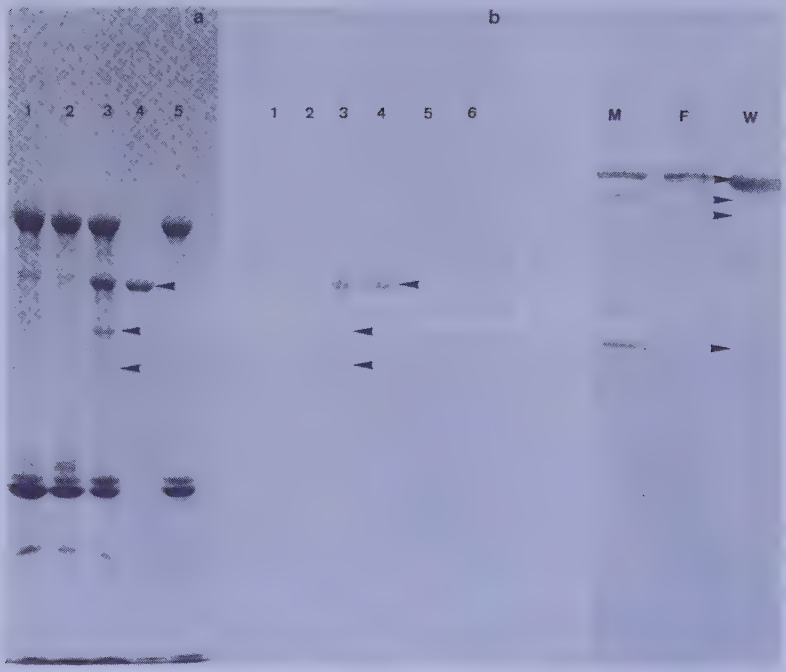


Abb.: 20

Abb.: 21

Die Ergenbisse von 3.3.2., 3.4.2. und 3.5. sprechen eindeutig für das Vorhandensein von Vitellogenin in der Hämolymphe von Drohnen.

Abb.2o:
Immunologische Identifikation des Vitellogenins nach Auftrennung der Hämolymphproteine über SDS-PAGE.
(a) SDS-PAGE (5-1o%), Färbung mit Coomassie Blue R 25o.
1. Drohnenhämolymphe (5d)
2. Drohnenhämolymphe (6d)
3. Ammenhämolymphe
4. Eihomogenat
5. Arbeiterinnen-Hämolymphe (od)
6. Drohnen-Hämolymphe (od)

Die weibchenspezifischen Banden Vg und a sind durch ► gekennzeichnet.

(b) Nitrocellulose-Filter nach Transfer der Hämolymph-Proteine aus dem SDS-PA-GEl. Die Banden, die mit dem Anti-Vg(H)-Serum reagierten, wurden mit einer an Antikörper gekoppelten Peroxidase nachgewiesen; es waren stets die Peptide Vg, a, b und f.

(c) Nitrocellulose-Filter mit Proteinen nach einer Trennung über 5-12,5%-SDS-PA-Gel. Immunologischer Nachweis mit anschließender Peroxidase-Reaktion.
M = Drohnenhämolymphe
F = Fettkörper-Homogenat
W = Ammenhämolymphe

Abb.21:
Quantitative IEP nach Laurell. Der Serum-Gehalt der Agarose betrug 1% Anti-Vg(H)-Serum. Die Proben 1-3 enthielten 1-3µl Vitellogenin-Standard. Alle weiteren Proben sind Hämolymphen von Drohnen verschiedenen Alters.

3.6.
Charakterisierung der Polypeptide a, b und f.

Da das eingesetzte Serum gegen die 2x über SDS-PA-Gele gereinigte Vitellogenin-Bande gewonnen wurde, ergaben sich mehrere mögliche Ursachen für die oben beschriebenen Kreuzreaktionen.

Verunreinigungen des Vitellogenins mit Spuren der Banden a und b sind nicht auszuschließen, da jedes der auf PA-Gelen aufgetrennten Proteine einen kleinen "Verteilungsschwanz" nach sich zieht. Für diesen Fall ist eine Titration mit Hämolymphen junger und alter Bienen nicht ausreichend, da diese 2 Banden immer nur mit dem Vitellogenin zusammen auftreten.

Nach einer anderen Überlegung könnten die Banden a, b und e bzw. f in irgendeiner Weise mit dem Vitellogenin in Beziehung stehen, was auch schon die Tatsache ihres gemeinsamen Auftretens vermuten läßt. So könnten sie Untereinheiten des nativen Vitellogenins sein oder ebenso Abbauprodukte des 18o Kd-Polypeptides.
Es schlossen sich daher folgende analytischen Versuche an:

Ammenhämolymphe wurde mit SDS-Probenpuffer ohne bzw. mit Überschuß an ß-Mercaptoäthanol für die SDS-PAGE aufgearbeitet. Dabei ließen sich nur kleine Veränderungen im Bereich zwischen 13o und 8o Kd erkennen. Es traten keine Veränderungen bzgl. Vg, a, b und f auf.

Zweidimensionale Auftrennungen der Proteine ergaben, daß die Banden alle aus der nativen weibchenspezifischen Fraktion stammen (Abb.1oa und b).

Nach einer Reinigung der isolierten Polypeptide über einen zweiten Elektrophoreselauf ergaben sich keine weiteren Aufspaltungsprodukte (Abb.22). Wurde dabei das isolierte Vitellogenin vor dem zweiten Lauf nochmals in SDS-Probenpuffer gekocht (3, 1o und 3o min), so entand bei gleichzeitiger Abnahme der Vitellogenin-Bande das Polypeptid b und zugleich ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von ca. 7o-72 Kd. Beide Banden nahmen mit Verlängerung der Kochzeit an Menge zu. Bei dieser Behandlungsmethode trat das Polypeptid a nicht auf.

Eine Inkubation von Eihomogenat in nativen Tris-Puffer bei 37°C für 1 - 15 min führte zu keiner Veränderung des Proteinmusters auf SDS-PA-Gelen.

Versetzte man Eihomogenat mit Hämolymphe frisch geschlüpfter Arbeiterinnen, um es evtl. spezifischen Proteasen auszusetzen, und inkubierte diese Mischung für o, 5, 12, 2o, 3o und 9o min bei 37°C, so war ebenfalls keine Veränderung des Proteinmusters zu erkennen (Abb.23).

3.6.1.
Proteinvergleich durch Peptid-mapping

Die über SDS-PAGE isolierten Banden Vg, a und b sowie die zur Kontrolle eingesetzten Banden A und C und BSA wurden mit Trypsin-lösungen verschiedener Konzentrationen verdaut (Cleveland et al.,1977), (Abb.24). Die Bande b enthielt zu wenig Protein, um nach dem Verdau noch ein Peptidmuster erkennen zu lassen. Die Peptidmuster der Banden Vg und a zeigten nach dem Trypsinverdau ein stark übereinstimmendes Muster. Es konnte durch Verwendung der Formel nach Calvert & Graber (1978) (siehe II.5.4.) mit $P = o,46x1o^{-5} < 0,01$ und $P = o,76x^{-7} < o,o1$ (Abb.24b) die Zufälligkeit dieser Übereinstimmungen ausgeschlossen werden.
Die Verdaumuster der Banden A (Abb.24), C und BSA zeigten ein von den Banden Vg und a abweichendes Muster.

Der Versuch,das nach einem Trypsinverdau erhaltene Peptidmuster immunologisch mit dem Anti-Vg(H)-Serum und anschließender PAP-Reaktion zu vergleichen, scheiterte an der wohl zu geringen Menge der Bande b. Die Vitellogenin-Verdau-Peptide zeigten eine sehr schwache positive Reaktion.

Abb.22:
Reinheits-Überprüfung der aus SDS-PA-Gelen isolierten Banden A, Vg und a mit einer zweiten SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung:
Amme = Ammen-Hämolymphe
A = Polypeptid A (22o K)
Vg = Polypeptid Vg (Vitellogenin, 18o K)
a = Polypeptid a (145 K)

Abb.23:
Protein-Muster nach Inkubation von Eihomogenat in Hämolymphe frisch geschlüpfter Arbeiterinnen nach 0, 5, 12, 20, 30 und 90 min bei 37°C.
Ao = Hämolymphe frisch geschlüpfter Arbeiterinnen
Ei = Eihomogenat
Ao + Ei = Mischung aus Arbeiterinnen-Hämolymphe und Eihomogenat.

Abb.24:
Enzymatischer Verdau der isolierten Polypeptid-Banden A, Vg und a mit Trypsin nach der Methode von Cleveland et al. (1977).
Sammelgel-Länge: 5cm, 3% Acrylamid
Trenngel: Gradient mit 3-2o% Acrylamid.
A = Polypeptid A (22o K)
a = Polypeptid a (145 K)
Vg = Vitellogenin (Vg, 18o K)
T = Trypsin
T_1 und T_2 = Trypsin in TES-Puffer (1% und 2%), überschichtet wurde mit lo µl Lösung.

Abb.23

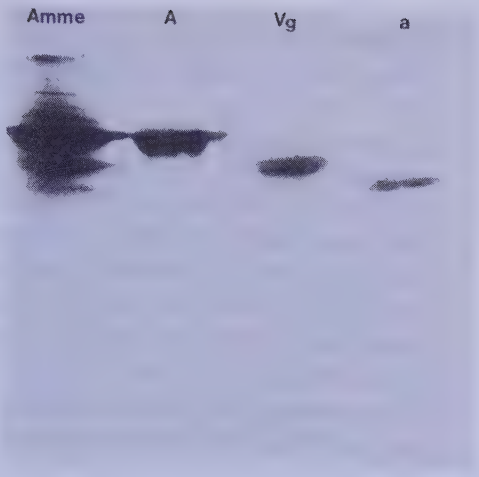


Abb.22

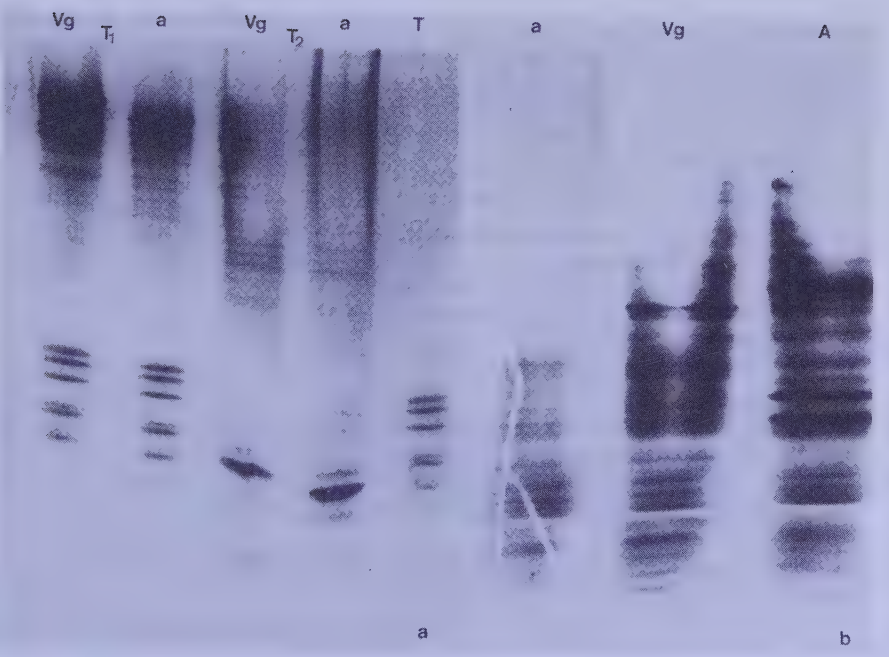


Abb.24

3.6.3.
Proteinanalyse mittels Säulen-Chromatographie

Es wurden Hämolymphpools von frisch geschlüpften Drohnen und von Ammenbienen (Alter 7 d) eingesetzt. Bei der Auftrennung der Hämolymphproteine über eine Mono-Q-Säule (Pharmacia, FPLC-System) wurde der größte Anteil der löslichen Hämolymphproteine mit o,1 M NaCl-Tris-Puffer eluiert. Ein anschließend angewandter NaCl-Gradient von o,1-1,o M in Tris-Puffer zeigte im Elutionsprofil vier deutliche Peaks. Zwei der drei kleineren Peaks sind auf die Drohnen beschränkt. Der dritte kleine Peak wird bei einer Salzkonzentration von o,28 M eluiert und ist bei Drohnen und Arbeiterinnen vorhanden.
Der große Peak bei einer Konzentration von o,33 M NaCl tritt nur bei den Arbeiterinnen auf (Abb.25b).

Abb.25a und b:
Charakterisierung der Hämolymph-Proteine mit Anionen-Austausch-Chromatographie:
Säule: MonoQ, FPLC-System (Pharmacia)
Elutionsgeschwindigkeit: o.5 ml/min

3ooµl Hämolymphe wurden mit o,1M NaCl/5omM TrisPuffer (pH 8,1) eluiert (A). Vitellogenin konnte mit einem o,1M-1,oM NaCl-Gradienten bei o,33M NaCl isoliert werden

(a) Hämolymphe frisch geschlüpfter Drohnen
(b) Ammenhämolymphe

Abb.25c:
Elutionsprofil einer Gel-Chromatographie der über Anionen-Austausch-Chromatographie erhaltenen Vitellogenin-Fraktion.
Säule: LKB TSK G 4ooo, FPLC-System (Pharmacia)
Elutionsgeschwindigkeit: 1ml/min
Die Elution erfolgte mit einem 2o mM Tris-Puffer, (pH 7,5)

Die Eichung derSäule wurde mit Ferritin (45o K), Katalase (24o), IgG (15o K) und BSA (68 K) durchgeführt.

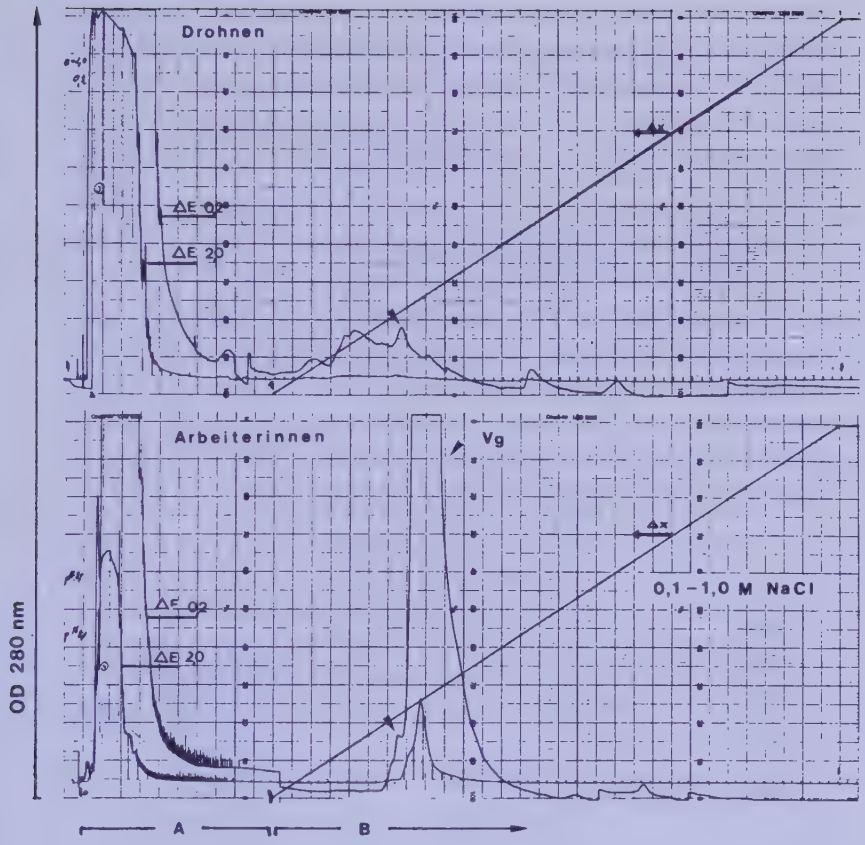


Abb.: 25 a und b

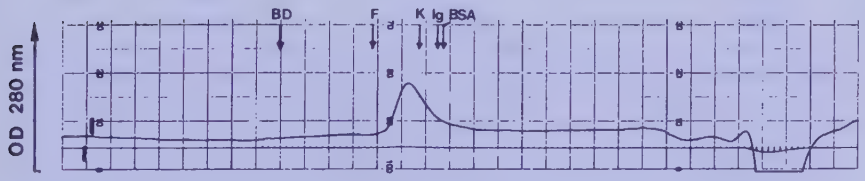


Abb.: 25 c

Die daraufhin durchgeführte Untersuchung der gesammelten Fraktionen mit SDS-PAGE (Silberfärbung) bestätigte die Annahme, daß in diesem Peak das Vitellogenin enthalten ist. Das Muster bestand aus den Polypeptiden Vg, a, b und f und einer kleinen Bande bei 7o-72 Kd. Diese Banden wiesen alle die gleiche Verteilung bzgl. der getesteten Fraktionen auf.
Neben diesen Banden waren noch kleinere Banden vorhanden. Sie besaßen jedoch ein anderes Verteilungsmuster.

Der Auftrennung über den Anionenaustauscher folgte ein zusätzlicher Reinigungsschritt über eine Molekularsiebsäule (LKB-TSK 4ooo). Es wurde nur ein Peak photometrisch erfaßt (Abb.25c). Durch Eichproteine konnte dem Proteinpeak ein Molekulargewicht von ca. 34o K zugeordnet werden (Abb.26). Die Überprüfung der diesem Peak zugehörigen Fraktionen mit SDS-PAGE ergab die Polypeptide Vg, a und f.

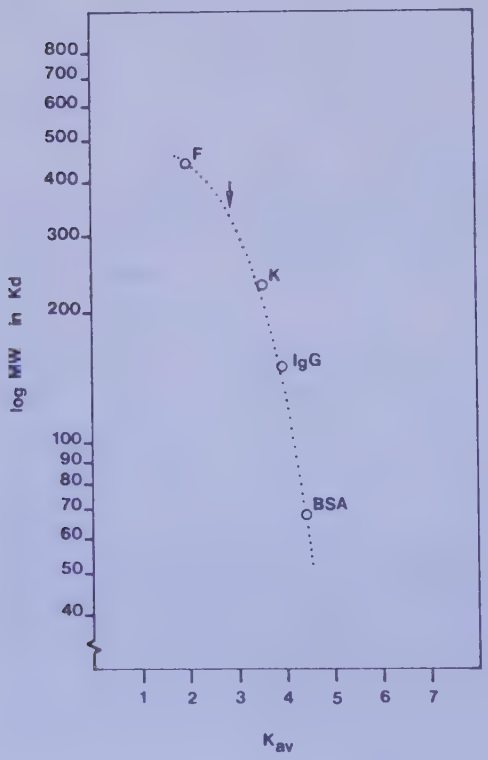


Abb.26:

Molekulargewichtsbestimmung über Gel-Filtration:

F = Ferritin
K = Katalase
IgG = Immunglobuline
BSA = Rinderserumalbumin

4.

Quantitative Proteinuntersuchungen

4.1.

Linearität der Proteinbestimmung

Mit Proben von 1-5 µl aus Hämolymphpools von Arbeiterinnen (Alter 12 und 13d) und Drohnen (Alter 0 und 5 d) wurde untersucht, ob die quantiative Protein-Bestimmung mit dem Bradford-Reagenz auch für das Proteingemisch der Hämolymphe einer linearen Gesetzmäßigkeit folgt. Dies konnte mit Regressionskoeffizienten von r=1,oo (12d), r=o,96 (13d), r=o,99 (od) und r=o,95 (5d) nachgewiesen werden.

4.2.

Hämolymphmenge und Proteingehalt

Bei gleicher Präparationstechnik schwankten je nach Zustand der Drohnen, z.B. ruhiges Verhalten bei kühlem Wetter und heftiges Brausen mit schneller Erschöpfung bei sonnigem Wetter, die erhaltenen Hämolymphmengen zwischen 2 und 3o µl. Es wurde daher bei zwei verschiedenen Altersgruppen untersucht, ob eine Abhängigkeit zwischen den gewonnenen Hämolymphmengen und ihrem Proteingehalt besteht (Abb.27).

Die statistischen Parameter für die untersuchten Hämolymphproben sind bei

3 Tage alten Drohnen:

Korrelationskoeffizient = - o,3o
Steigung = - o,27
F = 1,89
keine Korrelation für P ≦ o,1o

6 Tage alten Drohnen:

Korrelationskoeffizient	=	o,23
Steigung	=	o,2o
F	=	1,o3
keine Korrelation für P	≦	o,1o

Die Bestimmung des Hämolymphvolumens mit Amaranth erbrachten bis zu einer Inkubationszeit von 2h keine reproduzierbaren Ergebnisse

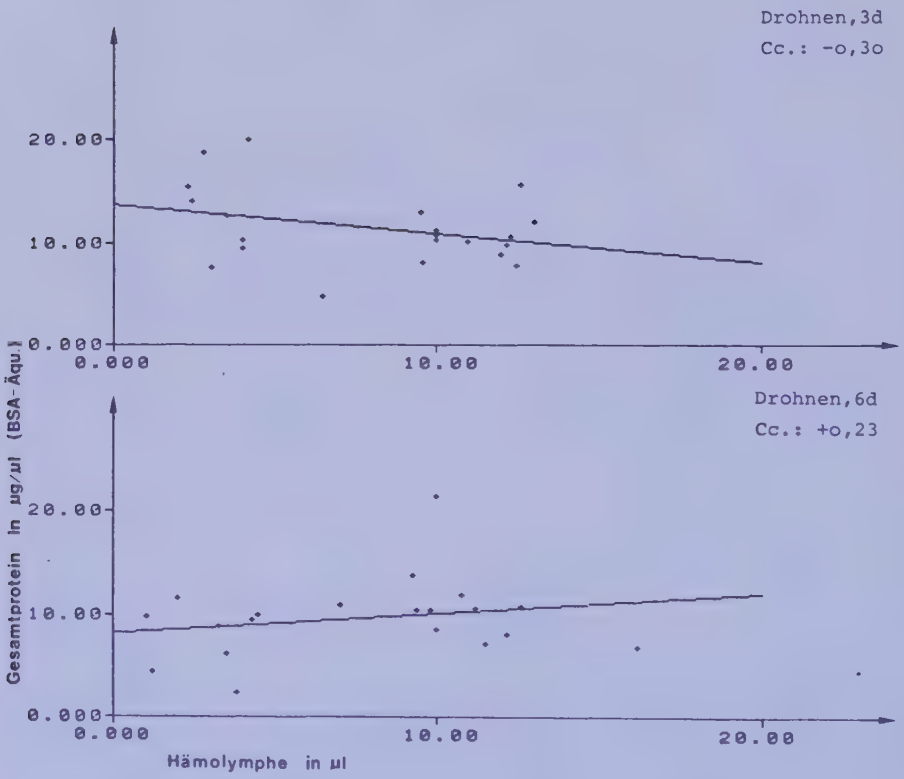


Abb.27:
Korrelations-Analysen über Protein-Gehalt und Hämolymphmenge der Drohnen. Plot-Diagramm des "IBAS"-Korrelations-Programm, Probengröße: n = 2o , Cc = Korrelations-koeffizient

4.3.

Gesamtprotein-Gehalt in der Hämolymphe von Drohnen

Zwischen dem 1. und 6. imaginalen Lebenstag schwankt der Gesamtproteingehalt in der Hämolymphe zwischen 9,4 und 11,2 µg/µl, um dann bis zum 13. Tag auf ein Niveau von ca. 4 µg/1 abzufallen (Tab.3 und Abb.37).

Tab.3:
Gesamtprotein-Gehalt unbehandelter, haploider Drohnen in Abhängigkeit des Alters.

Alter in d	Protein µg/µl	S.E.	S	n
0	5,50	0,4	1,7	17
1	9,56	1,1	3,5	11
2	10,08	0,9	3,6	15
3	11,24	0,7	3,7	30
4	9,46	0,6	2,4	17
5	10,34	0,8	4,1	28
6	9,38	0,4	2,3	37
7	7,71	0,5	2,1	22
8	7,97	0,4	2,3	30
9	6,71	0,6	2,3	17
10	6,99	0,4	1,6	19
11	5,36	0,5	1,9	18
12	6,28	0,4	1,4	12
13	4,42	0,5	2,1	20
14	4,37	0,7	2,2	10
15	3,92	0,5	1,6	9
16	3,88	1,1	2,4	5
17	3,30	0,4	0,8	4
18	3,27	0,9	1,6	3
19	4,37	0,8	2,0	6
20	4,60	0,5	1,4	8
22	3,21	0,5	1,3	8
24	3,17	0,8	1,4	3
25	4,33	0,3	0,9	7
26	5,00	0,7	1,7	6
27	3,60	0,4	1,0	7
30	8,08	1,0	2,5	6
32	2,93	0,5	0,8	3

Zum Vergleich dieser Daten wurde auch der Proteingehalt einzelner Pools von Arbeiterinnen-Hämolymphe bestimmt:

Alter in d	0	2	7	9	14	21
Protein µg/µl	11,7	17,5	16,8	12,8	11,4	12,7

4.4.
Vitellogenin-Gehalt der Drohnen

Der Vitellogeningehalt in der Hämolymphe von Drohen wurde mit der quantitativen IEP nach Laurell unter Verwendung des Anti-Vg(H)-Serums durchgeführt. Als Standard wurde über native Gel-Elektrophorese isoliertes Vitellogenin eingesetzt. Die Flächen der Präzipitations-Peaks wurden als BSA-Äquivalente ausgedrückt.

Der Antiserumgehalt (1%) und die Hämolymphmengen (1-4 µl) wurden so gewählt, daß eine lineare Beziehung zwischen Peakfläche und Proteinmenge gewährleistet war (r=o,986) (Abb.28).

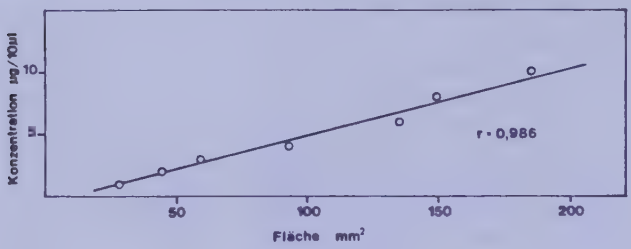


Abb.28

4.4.1.
Vitellogenin-Gehalt und Gesamtprotein-Gehalt

Die Auswertung der Datenpaare Vitellogeningehalt und Gesamtproteintiter ergaben bei verschiedenen Altersstufen Korrelationskoeffizienten von -o,45 bis o,62. Für n = 5-12 sind für eine Korrelation mit P = o,o5 Koeffizienten von o,59 - o,79 gefordert. Aufgrund der fehlenden bis nur schwachen Beziehung zwischen dem Vitellogenin- und dem Gesamtproteingehalt wurde der Vitellogenin-Gehalt auf die Hämolymphmenge bezogen.

4.4.2.
Vitellogenin-Gehalt haploider Drohnen

Einen Tag alte Drohnen (± 12h) zeigten hin und wieder kleine nicht quantifizierbare Präzipitationspeaks. Erst ab dem zweiten imaginalen Lebenstag konnte der Vitellogeningehalt mit o,33 µg/µl bestimmt werden. Der Titer steigt bis zum 4-5 Tag auf o,46 µg/µl, dies entspricht ca. 5% des Gesamtprotein-Gehalt, an und fällt danach auf ein Niveau von ca. o,2 µg/µl zwischen dem 8. und 14. Tag ab (Tab.4 und Abb.37).

Tab.4: Vitellogenin-Gehalt der Hämolymphe unbehandelter Drohnen

Alter in d	Vit µg/µl	S.E.	s	n
o	o,o	o,o	o,o	6
1	+			5
2	o,33	o,o8	o,21	7
3	o,37	o,o9	o,26	8
4	o,46	o,13	o,38	9
5	o,44	o,o9	o,26	9
6	o,26	o,o5	o,16	9
7	o,36	o,o9	o,24	7
8	o,19	o,o5	o,16	9
9	o,19	o,o5	o,19	8
1o	o,19	o,o6	o,21	11
11	o,3o	o,o9	o,23	6
12	o,13	o,o7	o,16	5
13	o,24	o,o9	o,25	7
14	o,o9	o,o2	o,o7	8
2o	o,21	o,1o	o,22	5
25	o,1o	o,o8	o,17	5
3o	+			6

Zum Vergleich durchgeführte Messungen mit Arbeiterinnen ergaben folgende Werte:

Alter in d	o	2	7	12	14	21
Vg in µg/µl	o,15	1,o	3,9-5,1	5,5	2,o	1,6
Vg in %	1,25	5,5	23,2-3o,1	2o,7	17,4	12,7

Zuletzt konnte mit der Methode des "Immuno-Blotting" bei Einsatz von 15 µl Hämolymphe auch bei frisch geschlüpften Drohnen (Alter nach dem Ausschlüpfen aus der Zelle max. 4 h) Spuren von Vitellogenin nachgewiesen werden.

4.5.

Proteinuntersuchungen bei diploiden Drohnen

Das allgemeine Hämolymph-Proteinmuster diploider Drohnen ergabe das gleiche Grundmuster wie das der haploiden Drohnen (Abb.29). Die Vitellogeninbande ist bei ihnen jedoch schwächer als bei gleichalten haploiden Geschwister-Drohnen.

Die quantitativen Bestimmungen ergaben ein ähnliches Bild (Abb.3o und Tab.5).

Tab.5:
Gesamtprotein- und Vitellogenin-Gehalt diploider Drohnen

	uk n	V82 n	V82 2n	uk n	V82 2n
Alter in d	5	5	5	6	6
Protein µg/µl	12,o ± 6,8	9,9 ± 4,8	13,1 ± 4,2	9,38 ± 2,3	13,5 ± 3,9
Vit. µg/µl	o,44 ± o,26	o,46 ± o,23	o,2o4 ± o,18	o,26 ± o,16	o,16 ± o,12
n	9	6	6	9	3

Der Vitellogeningehalt 5 und 6 Tage alter diploider Drohnen ist gegenüber dem der haploiden Drohnen um ca. 5o% erniedrigt. Wird der Vitellogenin-Titer in BSA-Äquivalenten ausgedrückt, besteht keine Signifikanz. Berücksichtigt man den bei diploiden Drohnen erhöhten Gesamtprotein-Gehalt, so unterscheiden sich die Vg-Werte der diploiden Drohnen signifikant von denen der haploiden Drohnen ($P \leq o,ol$).

Abb.29:
Hämolymph-Protein-Muster diploider Drohnen (SDS-PAGE:5-12,5%, Silberfärbung). Es wurden nur Einzeltier-Proben verwendet:
o = haploide und ● = diploide Drohnen der selben Königin (Inzuchtgrad:25%), Δ = haploide Drohnen unbekannter Herkunft, ◆ = Königinnen-Hämolymphe.
Die Ziffern geben das Alter der Tiere in Tagen an.
LM und HM = Molekular-Gewichts-Marker
Die Vitellogein-Bande ist durch ▷ gekennzeichnet.

Abb.3o:
Vitellogenin- und Gesamtprotein-Gehalt haploider und diploider Drohnen im Alter von 5 und 6 Tagen.
Offene Säulen = Gesamtprotein-Gehalt
schwarze Säulen = Vitellogenin-Gehalt haploider Drohnen
schraffierte Säulen = Vitellogenin-Gehalt diploider Drohnen

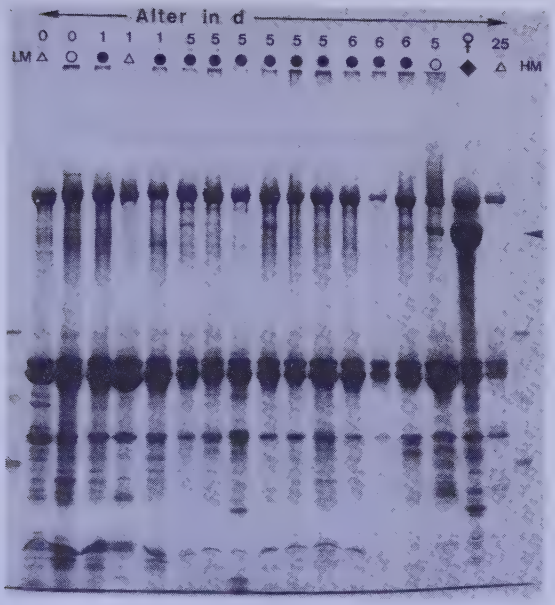

Alter in d
0 0 1 1 1 5 5 5 5 5 5 6 6 6 5 ♀ 25
LM △ ○ ● △ ● ● ● ● ● ● ● ● ● ○ ◆ △ HM

Abb. 29

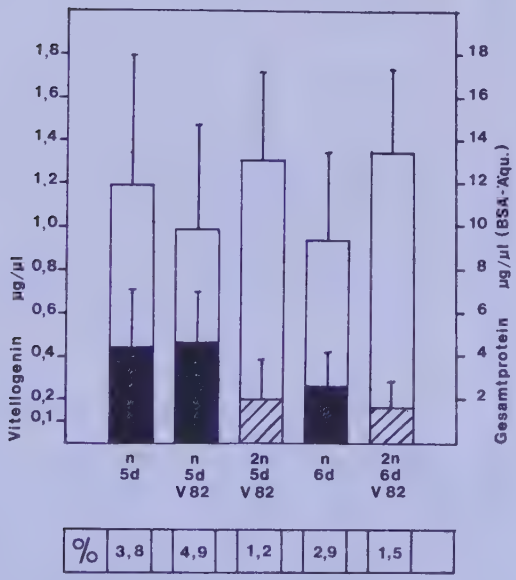

Vitellogenin µg/µl
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,1
Gesamtprotein µg/µl (BSA-Äqu.)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
n 5d
n 5d V 82
2n 5d V 82
n 6d
2n 6d V 82
%
3,8
4,9
1,2
2,9
1,5

Abb. 30

5.

Hormon-Applikationen

Die applizierten JH III Mengen von o,1 - 1o,o µg/Drohn entsprechen einer Dosis von o,4 - 4o,o µg JH III/mg Körpergewicht. Die ∝-Ecdyson-Dosen entsprachen o,2-2,o ng/mg Körpergewicht. Probenkennzeichnung: Injektionsalter/Präparationsalter (in d).

5.1.

Gesamtprotein-Gehalt der Hämolymphe (Tab.6)

Tab.6:
Gesamtprotein-Gehalt der Hämolymphe JH III behandelter Drohnen

Typ d/d	Dosis µg/Tier	Protein µg/µl	S.E.	S	n
o/1	o,1	7,oo	1,1	3,o	3
o/1	1,o	6,77	1,9	5,1	7
o/1	2,o	7,33	1,o	2,7	7
o/1	5,o	7,o5	1,2	2,4	4
o/2	o,1	5,84	o,8	2,3	9
o/2	o,5	4,19	o,6	1,8	9
o/2	1,o	5,27	o,6	1,8	9
o/2	2,o	8,o6	o,7	1,9	7
o/2	5,o	6,99	1,o	2,7	8
o/2	1o,o	7,46	1,3	3,7	8
o/3	1,o	8,5o	1,2	3,5	9
o/3	2,o	8,66	o,6	1,4	5
o/3	5,o	1o,46	1,o	3,3	11
o/4	o,5	7,48	1,1	2,5	5
o/4	1,o	13,4o	1,6	3,6	5
o/4	2,o	9,46	1,4	3,1	5
o/4	5,o	14,15	o,8	1,1	2
2/4	5,o	1o,2o	1,o	2,7	8
3/4	1,o	14,59	o,6	1,7	7
3/4	5,o	1o,1o	o,8	2,6	1o
o/5	1,o	11,o6	o,7	1,5	5
o/5	2,o	7,47	o,5	o,8	3
o/5	5,o	8,22	1,1	2,6	6
2/5	1,o	12,97	1,o	2,5	6
3/5	1,o	11,75	1,5	4,3	8
o/6	1,o	9,7o	o,8	1,7	5
o/7	1,o	6,55	o,5	1,4	9
5/7	5,o	9,57	o,9	3,o	11
o/8	1,o	7,3o	o,3	o,5	3
5/8	1,o	17,o8	2,3	5,1	5
6/8	1,o	7,95	1,3	3,6	8
5/1o	1,o	9,o8	o,6	1,5	7
8/1o	1,o	5,75	o,9	2,2	6
o/11	1,o	7,86	o,9	2,o	5
5/14	o,5	7,5o	1,4	3,1	5

Tab.6b-e

(b) Protein-Gehalt von Drohnen nach Injektion von JH III in Hexan
(c) Protein-Gehalt " " " " " " " " "
(Kurzzeit-Versuch)
(d) Protein-Gehalt der mit Öl, Hexan (H), Ringer (KR) oder physiolog. NaCl-Lösung injizierter Drohnen
(e) Protein-Gehalt von Drohnen nach Injektion von ∝-Ecdyson

b

Typ d/d	Dosis µg/Tier	Protein µg/µl	S.E.	S	n
o/1	o,1	1o,9	3,o	8,6	8
o/1	1,o	7,4	1,3	3,6	8
o/2	o,1	16,9	2,5	7,o	8
o/2	1,o	1o,4	1,6	4,9	1o
o/4	o,1	11,7	1,8	4,1	5
1/2	1,o	2,5	o,4	o,9	5
1/3	1,o	5,o	1,1	2,6	6

d

Typ d/d	Dosis Öl/KR	Protein µg/µl	S.E.	S	n
o/1	Öl	9,7	1,o	3,o	9
o/2	Öl	7,8	o,8	2,8	12
o/3	Öl	1o,2	1,1	3,8	12
o/5	Öl	9,3	2,o	4,8	6
o/7	Öl	12,55	1,4	2,o	2
o/3	H	6,2	o,2	o,4	3
o/5	H	11,2	2,5	4,4	3
o/5	KR	8,8	1,5	3,7	6
4/5	NaCl	6,7	1,7	3,o	3

c

Typ d/h	Dosis µg/Tier	Protein µg/µl	S.E.	S	n
o/1,5	1,o	11,o5	1,8	4,4	6
o/2	1,o	7,43	1,2	2,4	4
o/2,5	1,o	11,64	1,2	2,7	5
o/3	1,o	8,2o	1,o	2,9	9
o/5	1,o	1o,68	1,6	4,o	6

e

Typ d/d	Dosis ng/Tier	Protein µg/µl	S.E.	S	n
o/2	5oo	13,5	1,7	4,5	7
o/5	5o	14,6	1,1	2,5	5
4/7	5o	16,4	o,4	2,3	9

5.1.1.

Dosisabhängigkeit der JH-Wirkung

Die Untersuchung auf eine Dosisabhängigkeit ergab bei einer JH III-Injektion in frisch geschlüpfte Drohnen und Inkubationszeiten von 1-5 Tagen kein eindeutiges Ergebnis (Abb.31). Mit Ausnahme der 4-tägigen Inkubation ist eine schwache Erniedrigung des Gesamtproteintiters zu beobachten. Die Schwankungen sind jedoch beträchtlich.

5.1.2.

Einfluß der Inkubationszeit

Bei Inkubationen von 1-2 d sinkt der Proteintiter geringfügig ab, um sich danach wieder in den Bereich der unbehandelten Drohnen einzupendeln (Abb.32). Die Unterschiede zu den unbehandelten und den zur Kontrolle mit Olivenöl gespritzten Drohnen sind von wenigen Ausnahmen abgesehen nicht signifikant.

5.1 3.
Einfluß des Alters

Unter dem Vorbehalt, daß nicht alle Titeränderungen signifikant sind, zeigen frisch geschlüpfte Drohnen auf eine JH III-Applikation eine Erniedrigung ihres Hämolymphprotein-Titers. Applikationen im Alter von 2, 3 und 5 Tagen bewirken dagegen eine leichte Erhöhung des Proteintiters. Frisch geschlüpfte Drohnen, die durch lange Inkubationszeiten in das Alter von 4-6 Tagen kamen, reagierten auf eine JH III-Applikation sowohl mit Proteintiter-Erhöhungen als auch -Erniedrigungen.

5.1.4.
Ecdyson-Wirkung

Der Gesamtproteingehalt wird durch α-Ecdyson-Injektionen signifikant erhöht ($P \leq 0{,}05$).

5.2.
Vitellogenin-Titer

Es bestand keine Korrelation zwischen den Änderungen des Vitellogenin-Titers und des Gesamtproteintiters nach einer Hormon-Behandlung. Die Datenpaare hierfür, wie auch für alle anderen Untersuchungen, wurden von Einzeltiermessungen gewonnen. Die allgemein hohe Streuung der Versuchsergenisse (bis über 100%) läßt keine signifikanten Aussagen bzgl. einer Abhängigkeit des Vitellogenin-Titers von einer JH III- oder α-Ecdyson-Applikation zu (U-Test; Tab.7).

Tab.7:
Vitellogenin-Gehalt Hormon-behandelter Drohnen

(a) Injektionen mit JH III in Öl gelöst
(b) Injektionen mit JH III in Hexan gelöst
(c) Injektionen mit Öl bzw. Ringer (KR)
(d) Injektionen mit ∝-Ecdyson in Ringer gelöst

a.

Typ d/d	Dosis µg/Tier	Vg µg/µl	S.E.	S	n
o/1	1,o	o,o6	o,o3	o,o6	5
o/1	2,o	o,o7	o,o5	o,1o	4
o/1	5,o	o,o8	o,o8	o,o9	5
o/2	o,1	o,o9	o,o9	o,2o	5
o/2	o,5	o,oo	o,oo	o,oo	5
o/2	1,o	o,oo	o,oo	o,oo	5
o/2	2,o	+	-	-	6
o/2	5,o	o,o3	o,o2	o,o3	5
o/2	1o,o	o,oo	o,oo	o,oo	5
o/3	1,o	o,13	o,17	o,39	5
o/3	2,o	o,19	o,o8	o,19	5
o/3	5,o	o,32	o,1o	o,26	7
o/4	o,5	o,o5	o,o3	o,o6	5
o/4	1,o	o,58	o,13	o,29	5
o/4	2,o	o,54	o,13	o,29	5
o/5	1,o	o,2o	o,o7	o,16	5
o/5	2,o	o,27	o,o9	o,15	3
o/5	5,o	o,21	o,12	o,27	5
o/6	1,o	o,45	o,11	o,2o	5
o/7	1,o	o,53	o,1o	o,24	6
o/8	1,o	o,35	o,o7	o,16	6
o/11	1,o	o,15	o,o7	o,16	5
2/4	5,o	o,52	o,o9	o,25	8
3/4	1,o	o,6o	o,12	o,27	5
3/4	5,o	o,35	o,o9	o,2o	5
2/5	1,o	o,2o	o,o9	o,17	4
2/5	1,o	o,3o	o,13	o,34	7
5/7	5,o	o,35	o,1o	o,25	6
6/8	1,o	o,24	o,o5	o,1o	6
5/1o	1,o	o,2o	o,o7	o,16	5
8/1o	1,o	o,4o	o,o9	o,2o	5

b.

Typ d/d	Dosis µg/Tier	Vg µg/µl	S.E.	S	n
o/1	1,o	+	-	-	6
o/2	1,o	o,12	o,17	o,3o	3
o/3	o,1	o,22	o,o3	o,15	6
o/4	o,1	o,59	o,15	o,3o	4
1/2	1,o	o,2	o,13	o,3o	5
1/3	1,o	o,oo	o,oo	o,oo	5

c.

Typ d/d	Dosis Öl/KR	Vg µg/µl	S.E.	S	n
o/1	Öl	+	-	-	3
o/2	Öl	o,o7	o,o3	o,o8	6
o/3	Öl	o,31	o,o8	o,22	7
o/5	Öl	o,41	o,12	o,27	5
o/5	KR	o,45	o,11	o,28	6

d.

Typ d/d	Dosis ng/Tier	Vg µg/µl	S.E.	S	n
o/2	5oo	o,o4	o,o3	o,o7	6
o/5	5o	o,34	o,o5	o,13	7
4/7	5o	o,4o	o,o4	o,1o	6

5.3.

Beobachtungen über andere Hämolymphproteine

Nach Injektionen mit JH III oder Ecdyson und ebenso mit Olivenöl und o,9%-iger NaCl-Lösung wiesen die Hämolymphprotein-Muster in SDS-PA-Gelen neue Proteine auf. Aufgrund ihrer Quantität fielen besonders die mit X (68 K) und x (37 K) bezeichneten Banden auf (Abb. 33). Der Nachweis auf Kohlenhydrat durch PAS-Färbung fiel positiv aus.

Eine Analyse der Proteinmuster dieser Drohnen mit nativer PAGE ergab ebenfalls starke Veränderungen im Bereich der sonst schwach auftretenden drei sehr weit laufenden Fraktionen (Abb.34).

Das Auftreten dieser Proteine ist mit unterschiedlicher Intensität zu beobachten. Drohnen, die kurz nach dem Schlüpfen eine Injektion erhielten, reagierten nur schwach. Flugdrohnen verhielten sich ebenso. Gute reproduzierbare Ergebnisse lieferten Drohnen, die zum Zeitpunkt der Injektion 2, 3 oder 5 Tage alt waren. Eine volle Induktion kann bereits nach einem Tag erreicht werden (Abb.33) und der Titer wird mindestens 5 Tage aufrecht erhalten.

Die Coomassie-Blue-Färbung von SDS-PA-Gelen folgt bei λ = 53o nm im Bereich von ca. 5-25 µg/Proteinbande einer linearen Gesetzmäßigkeit (Abb.35). Der Titer des Protein X konnte bei voller Induktion mit ca. 1o% des Gesamtprotein-Titers bestimmt werden.

Abb.31 und 32: siehe Anhang

Abb.33:
Hämolymphprotein-Muster von JH III-behandelten Drohnen:
SDS-PAGE 5-12,5%, Coomassie Blue R 25o
3, 5, 6 = 3, 5 und 6 d alte unbehandelte Drohnen
3/4 und 3/5 = JH III-behandelte Drohnen: Injektionsalter: 3d
Präparationsalter: 4 bzw. 5d
JO1 und JO5 = JH III-Dosis= 1µg/µl bzw. 5µg/µl pro Drohn
Vg = Vitellogenin (18o K)
X und x sind die nach einer Injektion neu auftretenden Proteine

Abb.34:
Native PAGE (5-12,5%) von Hämolymphproben JH III-behandelter Drohnen
1o = unbehandeltes Kontrolltier (1od)
5/7 und 5/1o = JH III-behandelte Drohnen
Vg = native Vitellogenin-Fraktion
Die neu induzierten Proteine sind mit ► markiert.

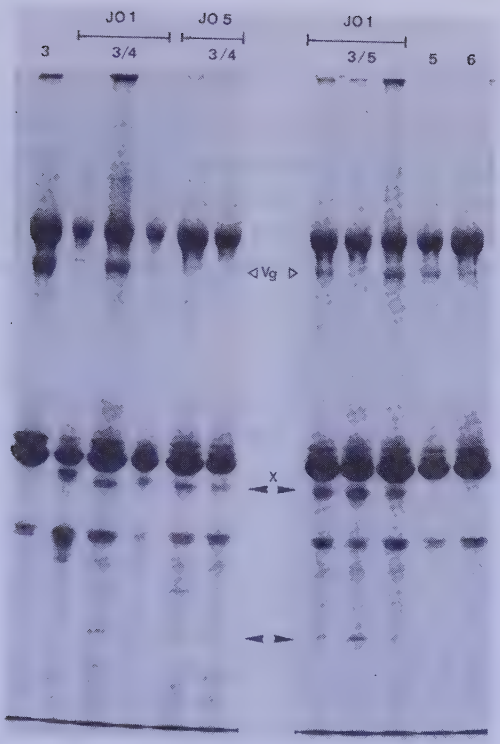


Abb.33

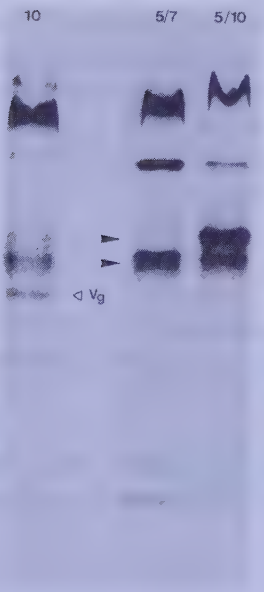


Abb.34

6.
Juvenilhormon-Bestimmung

Bei den durchgeführten Voruntersuchungen mit je 3oo µl Hämolymphe frisch geschlüpfter sowie 13 d alter Flugdrohnen zeigten nur die Ausgangskonzentrationen der Verdünnungsreihen eine positive Reaktion im Galleria-Wachs-Test. Mit der gleichen Ausgangsmenge an Ammenhämolymphe konnte eine vollständige Titrationskurve aufgenommen und der JH-Gehalt mit ca. 25o GU/ml Hämolymphe bestimmt werden (1GU = 35 pg JH III).

Auf die weitere Aufarbeitung der daraufhin durchgeführten Massenpräparation an Drohnenhämolymphe mußte aufgrund eines Betriebsunfalls verzichtet werden.

7.
Isolierung der DNS und Restriktionsanalyse

Die Lage der isolierten DNS zeigt (Abb.36a), daß die DNS der Bienen mit der hier angewandten Methode gut und in einer hochmolekularen Form isoliert werden konnte. Die Restriktionsanalysen weisen ein reproduzierbares Muster auf. Unter dem "Restriktionsschmier" liegen einzelne klar erkennbare Banden. Der Verdau mit Hae III zeigt stets höhermolekulare DNS-Bruchstücke gegenüber einem Verdau mit Eco RI.

7.1.
Hybridisierungsexperimente

Gegen den α-Klon des Hühner-Vitellogenin-Genomklons Ch Nit.1o. (Schuster) fand unter den gegebenen Bedingungen keine Hybridisierung statt.

Auch gegen den YPI-Klon (4 kb-Hind III-Fragment) aus Drosophila melanogaster (Hovemann et al. 1981) konnte keine Hybridisierung nachgewiesen werden.

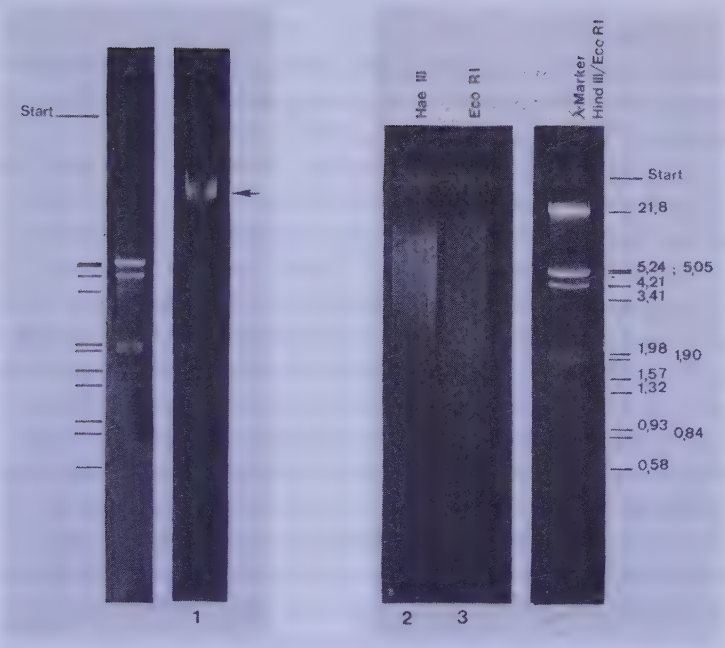


Abb.36a:
Darstellung isolierter DNS von APIS (1) in Agarose-Gelen im Vergleich zu dem mit Hae III und Eco RI verdauten λ-Marker (M).

Abb.36b:
Restriktions-Muster der APIS-DNS nach Verdau mit Hae III (2) und Eco RI (3) im Vergleich zu dem λ-Marker (Hae III/Eco RI verdaut).

Diskussion

Zur Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit, war es zunächst notwendig, die Hämolymph-Proteine, insbesondere das Vitellogenin eindeutig zu charakterisieren.

Charakterisierung der Bienenproteine Vitellogenin und Vitellin

Vitellogenin und Vitellin der Bienen können als immunologisch identische Glyko-Phospho-Proteine charakterisiert, ein Lipidanteil nicht nachgewiesen werden. Der Kohlenhydrat-Anteil ist relativ gering, da die PAS-Reaktion nur schwach ausfällt. Diese Ergebnisse stehen teilweise im Widerspruch zu den bisherigen von Hagmeister (1973, 1976) erhaltenen Daten. Hagmeister beschreibt das Bienenvitellogenin als Protein mit einem geringen Lipid- und einem fast nicht nachweisbaren Kohlenhydrat-Anteil. Eine schwache positive PAS-Reaktion der H3b-Bande (entspricht dem Vitellogenin) konnte aber schon Engels (1972) aufzeigen. Diese Unterschiede können auf die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der angewandten Methoden zurückgeführt werden.

Eine exakte Molekulargewichtsbestimmung des nativen Vitellogenins mit 34o K (Molekularsieb-Säule) und ca. 24o K (native PAGE) ist noch nicht abgeschlossen. Hagmeister (1976) gibt unter Verwendung von SDS-PAGE ein MG von 25o-3oo K an, wobei aber das elektrophoretische Verhalten der aufgeführten Referenzproteine (keine Aufspaltung in Untereinheiten) eher auf eine Elektrophorese unter nativen Bedingungen hinweist. Harnish & White (1981) geben für das native Vitellogenin 21o K (native PAGE) an. Die der Vitellogenin-Bande entsprechende Fraktion C_{1+2} von Bounais (1975) liegt im MW_R der Katalase von 24o K. Ähnlich große MG-Unterschiede erhielten Pereira & de Bianchi (1983) bei ihren Untersuchungen am Vitellogenin von RHYNCHOSCIARA AMERICANA, ebenfalls einem Phospho-Glyko-Protein. Außer bei LEUCOPHAEA MADERAE (o,14%; Engelmann &

Friedel, 1974), LOCUSTA MIGRATORIA (o,3%; Chen et al., 1978) und RHYNCHOSCIARA AMERICANA (1,3%; Pereira & de Bianchi, 1983) wurde bei Insekten noch kein weiteres Vitellogenin als Phospho-Glyko-Protein beschrieben. Diese Unterschiede können ebenfalls methodisch bedingt sein. Besonderen Einfluß auf die Molekulargewichtsbestimmung zwischen Säulen und Gelen haben Lipide, Kohlenhydrate und Phosphatreste (Pereira & de Bianchi, 1983) wobei Atlas et al. (1978) immer etwas höhere Werte bei einer Säulentrennung erhält. Bei der nativen PAGE wiederum ist bei Proteinen mit einem IP zwischen 5 und 6 und der Verwendung basischer Puffer (pH 8,8) die starke negative Ladung der zu trennenden Proteine (Kunkel & Pan, 1976) ebenso wie die Sekundär- und Tertiär-Struktur der Proteine zu beachten.
Der IP des Bienen-Vitellogenins liegt in diesem angegebenen Bereich (Paulino Simoẽs, persönliche Mitteilung).

Die elektrophoretischen Laufeigenschaften von Vitellogenin und Vitellin sind nicht immer einheitlich (Abb.5). Ähnliche Beobachtungen (Hagmeister, 1976; Paulino, 1977) veranlaßten Paulino Simoẽs (1984) Versuche über das Bindungsverhalten von Vitellogenin und Vitellin an unterschiedliche Lectine (Concavalin A, Lentil) durchzuführen. Aufgrund ihrer vorläufigen Ergebnisse kann ein quantitativer und/oder qualitativer Unterschied der Kohlenhydrat-Anteile zwischen Vitellogenin und Vitellin angenommen werden. Solche Phänomene sind ebenfalls bei anderen Insekten beschrieben worden (Huybrechts & de Loof, 1981).

Die unter den denaturierenden Bedingungen des SDS auftretenden weibchen-charakterisierenden Peptide (vgl. 3.2.) lassen sich eindeutig auf die native Vitellogenin-Fraktion zurückführen (vgl. 3.2./3.4.). Unterschiedliche Behandlungen mit Mercapthoäthanol führen zu keiner Veränderung dieser Peptide. Die Peptide mit 125 K und 72 K sind durch den Kochvorgang entstandene Bruchstücke des 18o K Polypeptids. Hierbei ist die rauhe Behandlungsmethode des Kochvorgangs von Bedeutung, da das isolierte 18o K Polypeptid bei Anwendung von "weicheren" Behandlungsmethoden nicht in diese Bruchstücke zerfällt. Dies Ergebnis deutet auf eine Sollbruchstelle im

Vitellogenin-Molekül hin. Die Reaktion dieser Peptide mit dem Anti-Vg(H)-Serum ist somit erklärbar.
Das 18o K Polypeptid konnte elektrophoretisch und immunologisch in Fettkörper-, Ei- und Ovarhomogenat sowie in der Hämolymphe eierlegender Bienenarbeiterinnen und Königinnen und der Ammenbienen nachgewiesen werden. Es ist gleichzeitig die stärkste Bande in den Hämolymph-Proben von Königinnen, Ei- und Ovarhomogenat und erfüllt somit die allgemein geforderten Bedingungen für Vitellogenin und Vitellin.

Vorläufig ungeklärt bleibt die Herkunft der Polypeptide a, e und f. Auch sie reagieren mit dem Anti-Vg(H)-Serum, das gegen das 18o K Polypeptid gewonnen wurde. Da diese Peptide jedoch nicht mit den verwendeten Methoden aus dem isolierten 18o K Peptid erhalten werden konnten, kann man davon ausgehen, daß sie keine Abbau-Artefakte des 18o K Peptids darstellen. Gegen eine Verunreinigung bei der Isolierung der Vitellogenin-Bande zur Antikörper-Gewinnung nach zweimaliger SDS-PAGE, bedingt durch das asymmetrische Verteilungsmuster von Proteinen in PA-Gelen, sprechen die Ergebnisse des Peptid-mapping sowie der große Abstand z.B. der Banden e und f zur Vitellogenin-Bande.

Das signifikant übereinstimmende Peptidmuster nach kontrollierten enzymatischen Restriktionsversuchen von Vitellogenin und dem Peptid a erklärt die Reaktion beider Banden auf den Vitellogenin-Antikörper. Ob das Peptid a eine Synthese-Vorstufe des Vitellogenins ist, können nur Puls-Versuche mit radioaktiven Aminosäuren und in-vitro Translation von isolierter Vitellogenin m-RNS, zeigen.
Eine weitere Möglichkeit ist es, sie als eine genetische Variante des Vitellogenin anzusehen, wie es beispielsweise für das larvale Speicher-Protein Lucilin gezeigt werden konnte (Thomson et al., 1976). Hierfür könnten die Beobachtungen sprechen, daß jeder Hämolymph-Pool ein für sich typisches Vg-a-Muster aufwies, welches keine Veränderung während der Lagerungszeit zeigte. Da jedoch bei Bienenarbeiterinnen nur Hämolymphpools und keine Einzeltiere (bei Drohnen zeigten nur vereinzelte Tiere beide Banden) untersucht wurden, können hier keine genetischen Rückschlüsse gezogen werden.

Die wenigen analytischen Untersuchungen mit SDS-PAGE, die zum Vergleich der Ergebnisse herangezogen werden können, sind die von Lensky & Skolnik (1980). Anhand der photographischen Abbildungen kann man die Peptide Vg, a, b, e und f den mit 6, 9, 11 und 29 bezeichneten Banden zuordnen. Da sie aber außer einer fehlenden Altersangabe ihrer Tiere auch keine Molekulargewichts-Angaben machen, können solche Vergleiche nur unter Vorbehalt durchgeführt werden. Außerdem scheinen einige Proben methodisch bedingte Artefakte aufzuweisen. So zeigt beispielsweise die SDS-PAGE-Auftrennung des isolierten Vitellogenins (Lensky & Skolnik, 1980) und die von Ovar- und Fettkörper-Homogenaten (Lensky & Rakover, 1983) eindeutige Degradations-Spuren.

Kunkel et al. (1984) konnte bei BLATTELLA GERMANICA einen Zerfall des Vitellogenin-Komplexes beobachten, wenn das Vitellogenin nicht in die Oocyten aufgenommen und dem Fettkörper wieder zugeführt wird. Ob ein vergleichbarer Vorgang bei den Bienenarbeiterinnen für das Auftreten der Banden Vg und a vorliegt, da bei weiselrichtigen Arbeiterinnen das Vitellogenin nicht in die Oocyten eingebaut wird, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nur vermutet werden.

Weibchenspezifität des Vitellogenin-Vorkommens

Das Vitellogenin ist i.d.R. nur während der Eireifungsphase in der Hämolymphe von Weibchen vorhanden. Es wird daher als weibchenspezifisch bezeichnet. Bei der Honigbiene APIS MELLIFERA konnte das Vitellogenin in beiden weiblichen Kasten von Engels (1972) und Engels & Fahrenhorst (1974) nachgewiesen werden.
Im Gegensatz zu Engels (1972), Rutz & Lüscher (1974) und Lensky & Skolnik (1980) konnte nun eindeutig der Beweis erbracht werden, daß Drohnen der Honigbiene zur Vitellogenin-Synthese befähigt sind.

Auf einzelne Ausnahmebeobachtungen von Fahrenhorst (1975) und Hagmeister (1976) und ersten positiven Hinweisen in meiner Diplomarbeit aufbauend, wurde Vitellogenin in der Hämolymphe normaler unbehandelter Drohnen immunologisch nachgewiesen und der Verlauf des Titers aufgezeigt. Zuletzt konnte mit der Immunoblotting-Technik (Nachweisgrenze ca. 1oo pg, Towbin et al., 1979) auch bei frischgeschlüpften Drohnen Vitellogenin festgestellt werden. Der Beginn der Vitellogenin-Synthese bei Drohnen muß daher ebenfalls wie bei Königinnen (Kaatz, 198o) in der Puppenphase liegen. Auch Lensky (197o) konnte das Auftreten der ersten "adulten Proteine" bei weißen Puppen zeigen.
Die scheinbar vorhandene Korrelation zwischen Vitellogenin-Titer und Gesamtprotein-Titerkurve konnte mittels Korrelationsanalysen von gepaarten Einzeltiermessungen nicht bestätigt werden. Der Vitellogenin-Titer der Drohnen wird vom Gesamtproteingehalt der Hämolymphe unabhängig reguliert. Korrelationsanalysen zwischen Hämolymphmenge und Proteingehalt zeigten, daß die Proteinkonzentration relativ konstant gehalten wird.

Der Anstieg des Vitellogenin-Titers bei Drohnen fällt mit ihrer allgemein erhöhten Hämolymphprotein-Syntheseaktivität (Zillikens, 1984) zusammen. In diesem Altersbereich (Stockperiode, Entwicklung der Geschlechtsreife) degenerieren die Testes, wandern die Spermien in die Samenblase (Mindt, 1962; Fyg, 1973), nimmt der Durchmesser der CA zu (Lamotke, 1969), verändert sich das Fettkörpergewebe (eigene Beobachtungen), wird die Flugmuskulatur aufgebaut und werden die Drohnen mit einer eiweißreichen Kost versorgt (Haydack, 197o). Anschließend beginnen die Drohnen mit ihren ersten Orientierungsflügen (Drescher, 1969).

Der Kurvenverlauf des Vitellogenintiters bei Drohnen (Abb.37) zeigt Ähnlichkeiten zu den von Engels & Fahrenhorst (1974) und Rutz & Lüscher (1974) aufgestellten Vitellogenin-Titerkurven der Bienenarbeiterinnen. Diese Beobachtung könnte im Hinblick auf die bei anderen Insekten-Männchen höchstens in Spuren auftretenden Vitellogeninmengen als ein "lack" bei der Repression der Vitellogenin-Gene interpretiert werden. Für Drohnen ist diese Annahme aufgrund

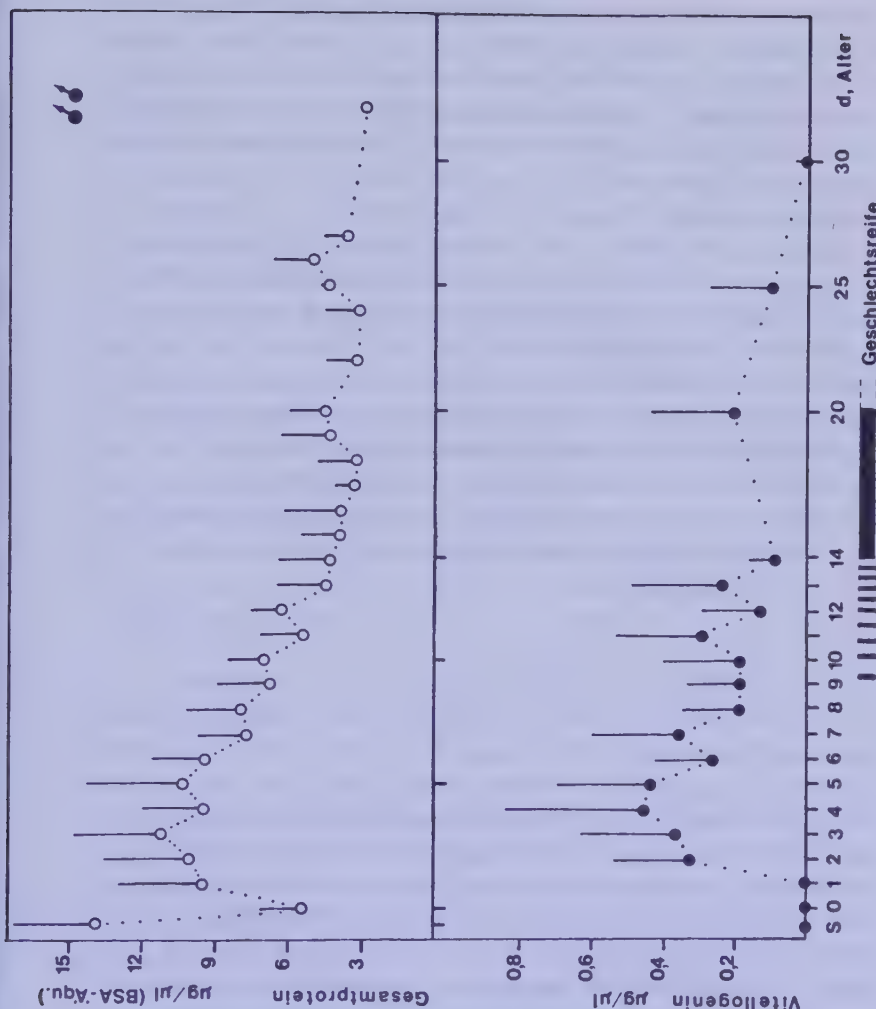


Abb.37: Titer-Änderungen der Hämolymph-Proteine bei imaginalen Drohnen von APIS MELLIFERA (mit Standard-Abweichungen). OF = Orientierungsflüge, HF = Hochzeitsflüge

des rel. hohen Vitellogenin-Titers und der hohen Vitellogenin-Synthese-Raten (Zillikens, 1984) nicht begründet. Entsprechende Vitellogenin-Titer wurden bei DIPLOPTERA PUNCTATA erst nach einer Applikation von ca. 5oµg ZR 512 (JH-Analogon) erreicht (Mundall et al., 1983).
Nur bei Männchen von GALLERIA MELLONELLA (Lamy, 1978) und RHODNIUS PROLIXUS (Chalaye, 1979; Harnish & White, 1982) wurden den Weibchen vergleichbare Vitellogenin-Titer beschrieben; exakte quantitative Bestimmungen liegen jedoch nicht vor.
Bei anderen Insekten-Männchen, bei denen Vitellogenin nachgewisen werden konnte, liegen die Titer um ca.das Tausendfache niedriger als die der Weibchen (HYALOPHORA CECROPIA, Telfer, 1954; BOMBYX MORI, Lamy & Julien-Laferiere, 1975; ONCOPELTHUS FASCIATUS, Rankin & Jäckle, 198o; vgl. auch Lamy, 1979).
Alle Versuche, die mittels Ovar-Transplantationen in männliche Empfängertiere gemacht wurden, um Aufschluß über den Vitellogenin-Haushalt der Männchen zu erhalten, müssen besonders kritisch neu überprüft werden, seit für DROSOPHILA MELANOGASTER (Srdić et al., 1979; Bownes, 1982b+c; Brennan et al., 1982) und auch für Bienen (Kaatz & Hagedorn, 1984) gezeigt werden konnte, daß die Ovarien selbst zur Vitellogenin-Synthese fähig sind.

Hormonelle Regulation des Vitellogenin-Vorkommens

Als mögliche Ursache für die geschlechtsspezifischen Unterschiede des Vitellogenin-Vorkommens wird besonders bei Dipteren (Huybrechts & de Loof, 1977, 1981; Postlethwait et al., 198o; Bownes & Nöthiger, 1981, Briers & Huybrechts, 1984), bei ONCOPELTHUS FASCIATUS (Kelly & Telfer, 1977; Rankin & Jäckle, 198o) und bei DIPLOPTERA PUNCTATA (Mundall et al., 1983) ein unterschiedliches hormonelles Milieu verantwortlich gemacht. Diese Interpretationen stützen sich auf Versuche, bei welchen durch Ecdysteroide oder Juvenilhormon das Vorkommen von Vitellogenin in Männchen induziert werden konnte.

Entsprechend den Vertebraten, konnten allerdings nur bei SARCOPHAGA

BULLATA (Briers & de Loof, 198o; Briers et al., 1983a,b,c) und DIPLOPTERA PUNCTATA (Tobe et al., 1979; Szibbo & Tobe, 1982; Mundall et al., 1983), die obige Annahme stützend, in vivo Unterschiede in Hormontiter bzw. der Aktivität ihrer Syntheseorgane gemessen werden. Dies zeigten beispielsweise Versuche an DIPLOPTERA PUNCTATA Männchen. Nach der Durchtrennung von Nervenverbindungen zu den CA steigt ihre JH-Synthese auf das Zweifache und in der Hämolymphe sind Spuren von Vitellogenin (weniger als o,1 µg/µl) feststellbar (Mundall et al. 1983).

Bei DROSOPHILA M. liegen leider bisher nur Hormonbestimmungen verschiedener Organe und Körperteile vor (Hodgetts et al., 1977; Handler, 1982; Bownes et al. 1984). Es ist noch ungeklärt, ob die beobachteten Unterschiede der 2o-Hydroxyecdyson-Titer für die Vitellogenin-Regulation verantwortlich gemacht werden können. Für eine solche Annahme könnte das kurzzeitige Auftreten des Vitellogenins nach Ecdyson-Injektionen in vivo bei DROSOPHILA-Männchen sprechen (Postlethwait et al., 198o und Bownes & Nöthiger, 1981). In vitro Versuche von Bownes (1982c) weisen dagegen auf andere Faktoren hin, denn hier konnte die Vitellogenin-Synthese bei Männchen nicht induziert werden.

Die ersten Juvenilhormonbestimmungen an Drohnen zeigten einen sehr großen Unterschied zu den gleichzeitig untersuchten Ammenbienen. Erst bei einer Einsatzmenge von 3ooµl Hämolymphe O oder 13 Tage alter Drohnen konnte eine positive Reaktion bei dem Galleria-Wachs-Test erzielt werden. Aufgrund kürzlich dargestellter vorläufiger Ergebnisse nehmen Rembold (1984) sogar ein vollständiges Fehlen von JH III bei Drohnen an. Die CA sind außerdem wesentlich kleiner als die der Arbeiterinnen und Königinnen (van Laere, 1971).

Versuche an Hummeln (Röseler, 1977) und an Bienenarbeiterinnen (Imboden et al., 1976; Rutz et al., 1976) ließen vermuten, daß das Juvenilhormon bzw. die CA an der Regulation der Fertilität und des Vitellogenin-Haushaltes bei Hymenopteren beteiligt sind (siehe auch tabellarische Zusammenstellung bei Trenczek, 1979). Allatektomie an

Bienenarbeiterinnen führte zum Ausbleiben des Vitellogenins, und es trat erst nach anschließender JH III-Applikation wieder in der Hämolymphe auf (Imboden et al., 1976). Der geringe Juvenilhormon-Spiegel könnte daher bei Drohnen für das ehemals angenommene Fehlen von Vitellogenin bzw. jetzt für den gegenüber den Weibchen niedrigeren Vitellogenin-Titer verantwortlich sein.

Daraufhin durchgeführte JH III-Injektionsversuche ergaben nach statistischer Auswertung keinerlei Signifikanzen für eine Erhöhung des Vitellogenin-Titers bei Drohnen.

Im Gegensatz zu den oben aufgeführten Autoren weisen die Ergebnisse von Ramamurty & Engels (1977), Daerr (1978), Engels (1978), Regel (1978) und Kaatz (198o) Übereinstimmungen mit den an Drohnen gewonnenen Ergebnissen auf. Ihre Allatektomie-Versuche sowie die Juvenilhormon-Applikationen an Bienen-Königinnen zeigten keinen signifikannten Juvenilhormon-Einfluß auf die Fertilität, der Vitellogenin-Titer-und Vitellogenin-Synthese-Regulation. Ebenso konnten Fluri et al.(1981) zwischen eierlegenden und nicht eierlegenden Königinnen keinen Unterschied im Juvenilhormon-Titer feststellen.

Es muß bei den aufgeführten Ergebnissen an Königinnen und Arbeiterinnen zweierlei beachtet werden:
1. Mit Ausnahme der Versuche von Kaatz (198o) wurden alle Untersuchungen zu einem Entwicklungs-Zeitpunkt angesetzt, an dem bei den Versuchstieren schon Vitellogenin in der Hämolymphe nachgewiesen werden kann. In Hämolymphproben von frisch geschlüpften Bienenarbeiterinnen, die als Kontrolle bei den Immunoblotting-Versuchen eingesetzt wurden, und bei den z.Zt. laufenden Untersuchungen von Braun mit Arbeiterinnen-Puppen kann Vitellogenin eindeutig nachgewiesen werden. Es sind bei den oben genannten Untersuchungen nur Rückschlüsse auf die Beteiligung des Juvenilhormons bei der Aufrechterhaltung des Vitellogenin-Stoffwechsels zulässig. Alle Versuche zu einer de-novo Induktion sollten vor dem ersten Auftreten des Vitellogenins in der Haemolymphe liegen. Aber auch zu diesem Zeitpunkt scheint weder Juvenilhormon noch Ecdyson eine direkte Rolle zu spielen (Kaatz, 198o). Ergebnisse, die Paulino Simoẽs (1984)

durch Juvenilhormon-Behandlungen an späten Larvenstadien und Puppen der Drohnen erhielt, sind wegen der schlechteren quantitativen Auswertbarkeit von 2-dimensionalen Immun-Elektrophoresen gegenüber der "rocket"-IEP kritisch zu betrachten.

2. Die Königinnen und Arbeiterinnen trennende Kastendetermination liegt ebenfalls schon in der Larvalzeit. Welche Weichen hier bereits für eine spätere Reaktionsmöglichkeit der u.U. genetisch identischen Tiere gestellt werden, ist bis heute noch nicht geklärt.

Mosaiktiere (Gynander) ermöglichen ebenfalls, mit einiger Vorsicht, einen Einblick in die endokrine Regulation des Vitellogenin-Haushaltes. Tiere mit männlichen Köpfen und weibliche Abdomina und umgekehrt weisen Vitellogenin in ihrer Hämolymphe auf (Fahrenhorst, 1973, Engels et al., 1975). Da innere und äußere Genitalien bei beiden Geschlechtern von DROSOPHILA in klonaler Abhängigkeit zueinander stehen (Dübendorfer, 1977), jedoch mit dem Vorbehalt, daß die äußere Morphologie nicht unbedingt die innere Anatomie bei Gynandern widerspiegeln muß (Drescher, 1975), könnte man vermuten, daß männliche wie weibliche CA und ihre entsprechenden Hormonausschüttungen zur Aufrechterhaltung des Vitellogenin-Titers fähig sind.

Die in diesen Zusammenhang aufgestellte Hypothese, daß eine spezifische Kompetenz der weiblichen Fettkörperzellen für die Vitellogenin-Synthese vorliegen muß (Engels et al., 1975) kann nicht mehr aufrechterhalten werden. Vitellogenin-Vorkommen und -Synthese bei Drohnen, und einzelne Ausnahmen bei den Untersuchungen an Gynandern (Vt 6, Engels et al., 1975; Vt 5, Vt 6, Vt 9, Fahrenhorst, 1973) sprechen eindeutig dagegen. Der fehlende Nachweis von Vitellogenin in einzelnen Gynandern (besonders bei unregelmäßigen Mischstrukturen und ältern Tieren) ist eher auf die zu geringe Empfindlickeit der von Engels et al. (1975) angewandten Untersuchungsmethode zurückzuführen. Außerdem sind keine immunologischen Tests für die Eindeutigkeit des Vitellogenins durchgeführt worden.

Bei Überlegungen, ob Hormon-Rezeptoren zu geschlechtsspezifischen Kompetenz-Unterschieden führen, muß, im Gegensatz zu Vertebraten,

bei Insekten berücksichtigt werden, daß bei beiden Geschlechtern Juvenilhormon und Ecdyson im Verlauf der Larvalentwicklung und der Metamorphose gleichermaßen benötigt werden und somit auch die entsprechenden Rezeptoren, um einen fehlerfreien Ablauf der Entwicklung zu gewährleisten. Eine Regulation über unterschiedliche Hormontiter oder über eine geschlechts-spezifische genetische Prädetermination scheint daher naheliegender.

Für Drohnen trifft ein direkter hormoneller Einfluß auf die Regulation des Vitellogenin-Titers nicht zu.

Genetische Kontrolle des Vitellogenin-Titers

Das Vitellogenin-Gen liegt bei den bisher untersuchten Arten DROSOPHILA MELANOGASTER und LOCUSTA MIGRATORIA auf den X-Chromosomen (Barnett et al., 1982; Wyatt et al., 1984).

Bei Arten mit Geschlechtschromosomen werden geschlechtsgekoppelte Gene von beiden Geschlechtern oft in gleichem Maße exprimiert, wie z.B. die Enzymaktivitäten von G6PD und 6PGD bei DROSOPHILA MELANOGASTER (Holmquist, 1972; Tobler et al., 1971), obwohl im heterogametischen Geschlecht nur die einfache Gen-Dosis vorliegt. Dies als Dosis-Kompensation bezeichnete Phänomen (Muller, 195o) wird u. a. durch Inaktivierung eines der X-Chromosomen, dem Barr-Körperchen der Mammalia (Lyon, 1972) oder durch Über-Aktivierung auf der Transkriptions-Ebene der einzeln vorliegenden X-Chromosomen bei DROSOPHILA-Männchen (Mukherjee & Beermann, 1965; Lakhotia & Mukherjee, 1969; Holmquist, 1972) erreicht. Davon betroffen sind hauptsächlich Gene von Enzymen, welche im allgemeinen Stoffwechselgeschehen benötigt werden.

Diesem Phänomen entgegengesetzt ist der Gen-Dosis-Effekt. Die Expression der Gene ist in diesem Fall mehr oder weniger proportional zur vorliegenden Gen-Dosis (Stern, 1929, 196o; Muller, 1932, 195o zit. nach Korge, 197o). Beispiele hierfür sind Beobachtungen über die RNS-Synthese und über die Enzym-Aktivitäten bei DROSOPHILA in besonderen genetischen Konstellationen wie Aneuploidie (Seecof et al., 1969; Korge, 197o), oder auch über autosomale Gene der Enzyme α-Glycero-phosphat-DH, Alkohol-DH und Malat-DH (O'Brien & Gethmann, 1973).
Eine von Goldschmidt (1954) geäußerte Vermutung, daß Gen-Dosis-Effekte oder Dosis-Kompensation durch die physiologischen Unterschiede beider Geschlechter bestimmt werden, welche ihrerseits wieder von den geschlechtsbestimmenden Genen abhängig sind, wurde von Smith & Lucchesi (1969) durch Untersuchungen über Augenfarben bei dsx-Mutanten von DROSOPHILA widerlegt.
Maroni & Plaut (1973) vermuteten aufgrund der oben genannten und

ihrer eigenen an triploiden DROSOPHILA-Weibchen gewonnenen Ergebnisse, in Anlehnung an die von Muller (195o) entwickelte Hypothese - Vermittlung der Dosis-Kompensation durch einen X-Chromosomen gekoppelten Kompensator - , daß viele geschlechtsgekoppelte Gene von einem gemeinsamen Regulationsfaktor abhängig sind. Die Verfügbarkeit eines solchen Faktors (Moleküls) für ein einzelnes Gen ist von seiner Menge, die durch seine autosomalen Gene synthetisiert wird, und gleichzeitig von der Anzahl der Gene, die von ihm reguliert werden, bestimmt.
Diese Hypothese weist in einzelnen Punkten Übereinstimmungen mit dem Britten-Davidson-Modell (1969) über die Regulation der Gen-Aktivität in Eukaryoten auf.

Die Ähnlichkeiten bei der Regulation der Geschlechtsbestimmung und Dosis-Kompensation bei DROSOPHILA MELANOGASTER über das X:A Verhältnis veranlaßten Cline (1978, 1979, 1983) dazu, eine gemeinsame genetische Kontrolle beider Phänomene anzunehmen. Hinweise hierfür fand er im sex-lethal-Locus (sxl).
Zusammen mit weiteren Ergebnissen wird bei DROSOPHILA eine hierarchische Ordnung regulatorischer Gene bzgl. der Geschlechtsbestimmung und der Dosis-Kompensation angenommen. Die in der Entwicklung des Embryo sehr frühe primäre Determination des Geschlechts und der Dosis-Kompensation durch das X:A Verhältnis ist irreversibel, wie Mutations-Defekte zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten gezeigt haben. Das Y-Chromosom spielt hierbei keine Rolle. Diese Determination wird durch regulatorische Gene wie sxl und da aufrechterhalten. Andere regulatorische Loci kontrollieren entweder die Aufrechterhaltung des somatischen Geschlechts (tra, tra-2, dsx, ix) oder die der Dosis-Kompensation (mle, msl-1, msl-2, msl-3). Alle Loci arbeiten zell-autonom. Es scheint daher, daß die von Bridges (1916, 1925) aufgestellte Gen-Balance-Hypothese in ihrem ursprünglichen Sinn aus molekularbiologischer Sicht nicht mehr aufrecht erhalten werden kann (Baker & Belote, 1983).

Zu den nicht dosis-kompensierten, X-Chromosom gekoppelten Loci gehören außer dem LSP-1 und dem bobbed-Locus auch die YP-Loci der Vitellogenin-Gene von DROSOPHILA (Postlethwait & Jowett, 198o; Ota et al., 1981; Baker & Belote, 1983). Die Expression der Vitellogenin-Gene bei DROSOPHILA ist nicht durch die X:A Balance per se abhängig, sondern von den sex-transformierenden Genen tra, tra-2 und dsx (Ota et al., 1981). So weisen u.a. XY/dsx Tiere in ihrer Hämolymphe Vitellogenin auf (Bownes et al, 1983), wohingegen bei XX/tra,tra Tieren kein Vitellogenin zufinden ist. Das Vorhandensein der Vitellogenine verhält sich invers zu dem Grad der Transformation in einen männlichen Phänotyp (Postlethwait et al., 198o) und es besteht eine Korrelation zwischen dem Vitellogenin-Titer und dem sexuellen Differenzierungsgrad der Gonaden (Ota et al., 1981). Durch Ecdyson-Injektionen kann allerdings das Auftreten von Vitellogenin in der Hämolymphe von normalen XY- und von XX/tra,tra-Männchen sowie XX/dsx-Pseudomännchen induziert werden (Bownes & Nöthiger, 1981). Wie Hormone und die sex-transformierenden Gene jedoch zusammenwirken, ist bis jetzt noch ungeklärt.

Über die Molekulargenetik der Geschlechtsbestimmung bei Bienen ist nichts bekannt . Alle bisher aufgestellten Hypothesen beruhen auf klassischen Kreuzungsversuchen u.a. erschwert durch das soziale Verhalten der Bienen. Unbestritten ist, daß für die Geschlechts-Bestimmung ein Gen, das X-Gen (mit multipler Allelie) verantwortlich ist. Die Frage erhebt sich nun, ob dieses Gen per se ausreicht, die primäre Determination und davon abhängige Differenezierungsschritte in Männchen oder Weibchen zu gewährleisten, oder ob außer dem X-Gen noch weitere die Weiblichkeit oder Männlichkeit determinierende Gene (Cunha & Kerr, 1957) für die morphologischen und physiologischen Unterschiede der Geschlechter verantwortlich sind.

Für diese Fragestellung wurden bisher nur morphologische Parameter untersucht. Woyke (1977a,1978a+b) verglich beide Drohnen-Typen mit Könniginnen und Arbeiterinnen während Chaud-Netto (1975, 1978) nur Arbeiterinnen zum Vergleich heranzog. Es wird in dieser Arbeit zum

ersten Mal versucht, auch einen physiologischen Parameter in diesen Zusammenhang zu interpretieren.

Charakterisierung der diploiden Drohnen:

Eine individuelle Unterscheidung zwischen haploiden und diploiden Drohnen ist nur am ersten Tag nach dem Schlupf möglich (Woyke, 1973, 1974, 1977; Chaud-Netto, 1977). Auch die spezielle Aufzucht-Technik erlaubt keine eindeutige Zuordnung der Drohnen (Hoshiba et al., 1981; Woyke, 1983, sowie eigene Beobachtungen). Es mußte daher der Ploidiegrad der Spermien zur Charakterisierung der diploiden Drohnen herangezogen werden.
Die von mir erhaltenen Werte stimmen gut mit den anhand anderer Methoden gewonnenen DNS-Bestimmungen überein (Jordan & Brosemer, 1974: $1{,}14 \times 10^{11}$ d/C = ca. o,19 pg/C und Crain et al.,1975: o,35 pg/Genom) und liegen im Vergleich zu anderen Hymenopteren-Arten im Erwartungs-Bereich (HABROBRACON JUGLANDIS: 0,16 pg/C und MORMONIELLA VITRIPENS: o,33 pg/C; Rasch et al., 1975).

Vitellogenin-Titer der Drohnen:

Völlig unerwartet liegt der Vitellogenin-Titer diploider Drohnen niedriger als der haploider Drohnen.

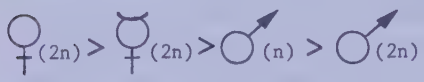
Der absolute wie auch der relative Vitellogenin-Titer der haploiden Drohnen (max. o,46 µg/l bzw. 5%) ist gegenüber dem der hier untersuchten Arbeiterinnen (max. 5,5 µg/l bzw. 3o%) stets niedriger.
Der absolute Vitellogenin-Titer der untersuchten diploiden Drohnen ist um durchschnittlich 5o % niedriger als der gleichaltriger haploider Drohnen. Wird ihr Vitellogenin-Gehalt auf den Gesamt-Proteintiter relativiert, so unterscheiden sich alle Werte zwischen haploiden und diploiden Drohnen signifikant ($P \leq$ o,ol).
Keiner der 5 und 6 Tage alten diploiden Drohnen ist Vitellogenin-frei.

Dies bedeutet zum einen, daß kein Gen-Dosis-Effekt bzgl. des Vitel-

Alter in d	No.	Gewicht mg Od	Gewicht mg Pd	Häkchen	DNS AE.	Protein µg/µl	Vg µg/µl	Vg %
0	B	27o	-	-	-	-	-	-
0	F	21o(†)	-	-	-	-	-	-
1	Ch	251	-	17/18	-	11,5	o,o	o,o
1	66	25o	-	17/18	o,62	15,6	o,o	o,o
1	96	23o	-	17/17	-	-	-	-
5	56	25o	298	17/18	o,69	9,6	o,18	o,63
5	51	29o	327	19/19	o,71	19,3	o,47	2,41
5	52	27o	279	24/25	o,67	-	o,11	-
5	53	27o	29o	18/23	o,65	13,3	-	-
5	54	25o	3oo	17/17	o,7o	14,5	o,26	1,81
5	55	295	298	17/18	o,74	8,8	+	+
6	94	31o	324	18/19	o,55	16,o	o,14	o,85
6	95	25o	275	19/22	o,7o	15,5	o,o5	o,34
6	97	3oo	313	18/23	o,76	9,o	o,29	3,21

Tab.8:
Zusammenfassung der biometrischen und physiologischen Daten diploider Drohnen.
(Od = Tag des Schlupfes, Pd = Tag der Präparation; AE = Arbeits-Einheiten)

logenin-Gens vorliegt und spricht ebenso eindeutig gegen die von Cunha & Kerr (1957) postulierten weiblich-determinierenden Faktoren. Ordnet man die Bienen-Typen in Abhängigkeit ihres Vitellogenin-Titers an, so ergibt sich die folgende Aufstellung:



Diese Reihe entspricht der Annahme, daß diploide Drohnen super-male-Charaktere aufweisen (Chaud-Netto, 1975; Woyke, 1973-1983).

Bei der Übertragung der von Bridges (1916, 1925) aufgestellten Hypothese der Gen-Balance auf die Bienen nahmen Cunha & Kerr (1957) einen kumulativen Effekt der weiblich-determinierenden Faktoren an, weil sich das Verhältnis der hypothetischen männlich- und weiblich-determinierenden Faktoren zwischen haploiden und diploiden Chromosomen-Satz nicht verändert, "in other words, maleness genes show dosage compensation and the femaleness genes do not" (Kerr, 1975). Nach dem Nachweis von diploiden Drohnen (Woyke, 1962-65, Woyke & Knytel, 1966) wurde ein Verlust der Additivität für den weiblich-determinierenden Hauptfaktor im heterozygoten Fall angenommen Kerr, 1967). Alle weiteren weiblich-determinierenden Faktoren sollten sich mehr oder weniger stark in verschiedenen Eigenschaften der diploiden Drohnen ausprägen. Ergebnisse über die Morphologie der larvalen Genitalregion diploider Drohnen schienen dies zu bestätigen (Kerr & Nielsen, 1967).
Die obige Annahme hätte allerdings auch die Ausprägung von Intersexen zur Folge (Kerr & Nielson, 1967, vgl. auch Engelmann, 1976), was die ausführlichen Untersuchungen von Woyke (1977-1978) nicht bestätigen konnten. Der einzige bisher beschriebene Fall von Intersexen (aufgrund des Ploidie-Grades: Drohnen triploider BOMBUS ATRATUS-Arbeiterinnen, Garofalo & Kerr, 1975) ist wegen fehlender Chromosomen-Analyse nicht abgesichert. Ähnliche Merkmale wie die aufgeführten morphologischen können ebenso bei Gynandern beobachtet werden (vgl. Dobzhansky, 1928, 1931; Nöthiger et al., 1977). Weiterhin stellte Woyke (1974) fest, daß die Reduktion der

Testesgröße diploider Drohnen von der Homozygotie des X-Allele abhängt und nicht der X-Allel-Komposition folgt. Auch keine anderen Loci als der X-Loci zeigten einen Einfluß auf die Testes-Größe.

In Übereinstimmung mit den aufgeführten Ergebnissen von Woyke (198o, 1983), der den Hauptunterschied zwischen diploiden und haploiden Drohnen in der Größe der Tiere sieht (evtl. durch unterschiedliche Polyploidisierung der Gewebe) und keine Verschiebung in der Sexualausprägung annimmt, scheint der niedrige Vitellogenin-Titer diploider Drohnen gegen die von Cunha & Kerr (1957) angenommene Balance-Hypothese mit weiblich-determinierenden Faktoren zu sprechen. Ohne genanalytische oder cytogenetische Beweisführung können Annahmen wie die der weiblich- und männlich-determinierenden Faktoren von verschiedenen Wirkungsgraden nur im Bereich des Hypothetischen bleiben (Mainx, 1979).

Gen-Dosis-Effekt

Ein Gen-Dosis-Effekt auf den Vitellogenin-Titer, wie er bei DROSOPHILA vermutet wird (Postlethwait et al., 198o; Ota et al., 1981), liegt bei APIS MELLIFERA nicht vor.
Ein einfacher von der Geschlechts-Bestimmung unabhängiger Gen-Dosis-Effekt, bei gleichzeitiger Kopplung des Vitellogenin-Locus an den X-Locus, müßte zu einem erhöhten Vitellogenin-Titer bzw. -Synthese bei diploiden Drohnen führen. Ist das Vitellogenin-Gen nicht an den X-Locus gekoppelt, so kann das Vitellogenin-Gen in diploiden Drohen zu 5o% heterozygot vorliegen. Unter der Annahme, daß nur der heterozygote Fall zu einer Erhöhung des Vitellogenin-Titers führt, kann ein Vitellogenin-Titer zwischen dem der Drohnen und dem ersten Fall angenommen werden.
Keiner der theoretisch angenommenen Fälle stimmt mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse überein.

Ein weiteres Beispiel für einen fehlenden Gen-Dosis-Effekt bei

Bienen ist die Expression der Augenfarb-Mutante laranja (Woyke, 1971, 1973b) und des ac-Gens (Woyke,1971). Zwischen den Augenfarben beider Männchentypen besteht kein Unterschied, wohl aber zu der Augenfarbe der Weibchen (Woyke, 1973).

Mit dem Vorbehalt, daß eine Vitellogenin-Synthese-Bestimmung eine eindeutigere Aussage zuließe, und bisher keine Daten über den Polyploidie-Grad des Fettkörpers adulter Bienen vorliegen, ist anzunehmen, daß der Vitellogenin-Titer diploider Drohnen über die Homozygotie des X-Gens und der damit verbundenen Determination zum männlichen Geschlecht beeinflußt wird.

Die Geschlechts-Spezifität des Vitellogenin-Vorkommens kann auf differentielle Genaktivitäten während der geschlechts-determinierenden Entwicklungsphase zurückgeführt werden. Dies erklärt aber nicht, welche Faktoren (intrazelluläre Regulatormoleküle, Hormone) für die Aktivierung der Gene verantwortlich sind. Aufgrund der dargestellten Ergebnisse liegt bei Bienen keine geschlechts-spezifische Repression der Vitellogenin-Gene bei Drohnen vor, jedoch eine geschlechts-spezifische Regulation der Vitellogenin-Titerhöhe. Hierbei scheinen Abbaumechanismen des funktionell nicht notwendigen Vitellogenins stärker als eine Herabsetzung der Vitellogenin-Synthese beteiligt zu sein (vgl. auch Zillikens, 1984). Diese Regulationsvorgänge werden weder durch Juvenilhormon noch durch Ecdyson beeinflußt. Ungeklärt bleibt weiterhin, ob eines der beiden Hormone bei der Induktion der Vitellogenin-Synthese, die bei allen drei Bienen-Typen in der Puppen-Phase zu suchen ist, beteiligt ist.

Ausblick

Für die Aufklärung der weiterhin offenstehenden Fragen sollten die Versuche auf molekular-biologischer Ebene fortgeführt werden. Hierzu möchte ich vorschlagen, daß die Vitellogenin m-RNS sowie die Vitellogenin-DNS charakterisiert und daran anschließend die Vitellogenin-DNS kloniert wird. Mit diesem DNA-Klon können dann gezielte Versuche zur Expression des Vitellogenin-Gens auf molekularer Ebene durchgeführt werden. Nur solche Experimente können einen Beitrag für die Theoriebildung der Genexpression leisten.

Induktion neuer Proteine

Das Auftreten neuer Proteine nach Injektionen von JH III und Ecdyson konnte ebenso nach Kontrollinjektionen mit Olivenöl und verschiedenen Salzlösungen (K-Ringer und o,9%iger NaCl-Lösung) beobachtet werden. Dieses Phänomen trat bei Drohnen und Arbeiterinnen auf. Durch ihren hohen relativen Anteil (bis über 10% für X) am Gesamtprotein-Titer fielen besonders die Polypeptide mit 68 K (X) und 37 K (x) auf. Dieser Wert kann bereits nach einem Tag erreicht werden, und wird mindestens 5 Tage aufrecht erhalten. Kürzere Inkubationszeiten wurden nicht untersucht. Erstaunlicherweise reagieren Drohnen erst ab einem imaginalen Alter von 2 Tagen deutlich und mit reproduzierbaren Ergebnissen auf die Injektion. Für das 68K Polypeptid konnte der Nachweis auf Kohlenhydratreste (PAS-Reaktion) erbracht werden.

Kontrollversuche ergaben, daß das Auftreten dieser Polypeptide nicht durch Lagerungs- oder Aufarbeitungsartefakte bedingt sind. Weiterhin konnte Zillikens (1984) zeigen, daß beide Polypeptide X und x bereits 6 h nach Injektion mit einem Anteil von 2o-4o% bzw. 1-9% an der Gesamtprotein-Syntheserate synthetisiert werden. Bei unbehandelten Drohnen tritt keine Synthese von X und x auf. Dieser Induktion liegt jedoch keine spezifische Hormonwirkung zugrunde, wie die Kontrollexperimente zeigten.

Welche Bedeutung besitzen diese neuen Proteine und welches ist der induzierende Faktor?

Da sämtliche Injektionen unter nichtsterilen Bedingungen durchgeführt wurden, liegt die Vermutung nahe, daß mit injizierte Fremdstoffe zu einem Abwehrmechanismus in der Hämolymphe der Tiere geführt haben.
Obwohl es allgemein akzeptiert wird, daß Insekten und andere Invertebraten keine den Vertebraten vergleichbare Immunglobuline besitzen, so zeigen aber auch sie Mechanismen der Selbst-Nichtselbst-Erkennung wie z.B. das Abstoßen von fremden Zellen und Geweben (von Senghbusch,

1979). Den ersten Nachweis der antibakteriellen Eigenschaft der Insektenhämolymphe erbrachte schon Glaser im Jahr 1918 (zit. aus Mohrig & Messner, 1968). Erst in den letzten Jahren konnten verschiedene Arbeitsgruppen feststellen, daß Insekten effiziente Immunsysteme mit zellulären und humoralen Komponenten enthalten, (Boman et al., 1974; Hultmark, 198o). Die bisher bekannten humoralen Komponenten sind Lysozyme (Mohrig & Messner, 1968), Cecropine (Boman & Steiner, 1981; Boman & Hultmark, 1981) und Attacine (Hultmark et al., 1983; Engström, 1984). Diese Proteine besitzen alle antibakterielle Eigenschaften, wobei Unterschiede bzgl. der Reaktion der beteiligten Komponenten auf gram - und gram +, sowie zwischen lebenden und abgetöteten Bakterien beobachtet werden konnten. Ebenso reagierten diese Proteine auf verschiedene Bakterienarten mit unterschiedlicher Spezifität (Boman & Steiner, 1981). Ähnliche Befunde liegen auch für LOCUSTA MIGRATORIA (Hoffmann, 198o) und GALLERIA MELLONELLA (Hoffmann et al., 1981) und weitere Lepidopteren vor (Boman & Steiner, 1981; Hughes et al., 1983).

Die Induktion neuer Proteine konnte auch durch chinesische Tusche, sterile Salzlösungen (Mohrig & Messner, 1968; Faye et al., 1975) oder durch einfache Wundsetzung (Wyatt, 1978) hervorgerufen werden. Hierzu gehört das Immunprotein P4 von HYALOPHORA CECROPIA, dessen biologische Bedeutung noch unbekannt ist. Diese letzteren Phänomene werden auf eine Wundreaktion zurückgeführt. Eine Schwierigkeit der Unterscheidung zwischen Immunantwort und Wundreaktion besteht darin, daß u.U. Wundreaktion und Immunabwehr gekoppelt sein können, da in der Natur einer Infektion meist eine Wundsetzung vorausgeht (Boman & Steiner, 1981).

Für die Interpretation der neugebildeten Bienen-Proteine ist vor allem interessant, daß die bei anderen Insekten gefundenen Induktionen von Immun-Proteinen ähnlich schnell verlaufen (Cecropia 8-1o h, Boman & Steiner, 1981 und Locusta 6-12 h, Hoffmann, 198o) und wie diese in einem ähnlich niederen Molekulargewichtsbereich liegen. Ein weiterer Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang

zwischen antibakterieller Aktivität und Proteinsynthese ergibt sich aus Beobachtungen von Kaatz (pers. Mitteilung), daß im Medium von in vitro inkubierten Fettkörpern keine Bakterien wachsen. Wurde jedoch für bestimmte Kontrollexperimente dem Medium Cycloheximid zugesetzt, so trat Bakterien- und Pilzwachstum ein. Ähnliche Beobachtungen beschreibt Cherbas (1973) bei HYALOPHORA CECROPIA. Der Hauptbildungsort der Immunproteine von HYALOPHORA CECROPIA scheint der Fettkörper zu sein (Faye & Wyatt, 198o; Boman & Steiner, 1981). Untersuchungen von Gilliam & Jeter (197o) wiesen ebenfalls eine antibakterielle Wirkung der Bienenhämolymphe auf.

Eine andere Erklärung der Induktion neuer Bienenproteine könnte eine mögliche "Stress-Reaktion" der Bienen auf die Injektionen sein, wie sie für Tetrahymena nach Histidinol-Applikation (Ron & Wheathy, 1984) oder für heat-shock Proteine diskutiert wird (Lindquist, 1981; Ashburner, 1982). Heat-shock Proteine liegen im Molekulargewichtsbereich von 84-68 K und 3o-2o K (Sangh, 1984) und ihre Gene sind hoch konservativ (Kelly & Schlesinger, 1982). Ihre Induktion kann nicht nur durch "Hitze" sondern auch durch Aminosäure-Analoga, Stoffwechselinhibitoren oder Virusinfektionen erreicht werden (Kelly & Schlesinger, 1982; La Thangue, 1984). Darüberhinaus können heat-shock Proteine auch in nicht behandelten Zellen synthetisiert werden, wie es u.a. für das Protein p68 aus Rattenembryo-Fibroblasten-Zellkulturen zutrifft (La Thangue, 1984). Ebenso konnten die Bienenproteine X und x in sehr seltenen Fällen bei unbehandelten Tieren beobachtet werden.
Möglich ist aber auch, daß diese Tiere vor ihrer Präparation eine Verletzung hatten. Zuletzt sei noch erwähnt, daß für die heat-shock Proteine ein "Mimic-Effekt" nicht ausgeschlossen wird (Sangh, 1984), daher können bei der Induktion solcher Proteine mehrere Effekte, wie sie durch Wund-, Stress- und Immun-Reaktion erzielt werden, überlagert sein.

Welche der Interpretationsmöglichkeiten für die neu induzierten Apis-Proteine zutrifft müssen zukünftige Versuche mit Vaccinationen und anschließenden antibakteriellen Tests abgeklärt werden.

Hybridisierungsversuche

Die bisher charakterisierten Vitellogenine und Vitelline, sowohl der Insekten als auch der Vertebraten, zeigen auffällige Übereinstimmungen in Molekulargewicht, Zusammensetzung aus großen und kleinen Untereinheiten und post-translationale Modifikationen zu Phospho- bzw. Lipo-Glykoproteinen. Das Apis-Vitellogenin mit der Haupt-Untereinheit von 18o K als ein Phosphoglykoprotein entspricht diesen Gegebenheiten.

Untersuchungen von Hagmeister (1973,1976) wiesen eine immunologische Teilidentität zwischen den Vitellogeninen der vier APIS-Arten nach. Der Grad der Übereinstimmung zwischen den Vitellogeninen korreliert zu den mit anderen Methoden gewonnenen Aussagen über die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Gattung APIS.
Die vorläufigen Ergebnisse der immunologischen Kreuztests zwischen APIS MELLIFERA und SCAPTOTRIGONA POSTICA mittels Anti-Apis mellifera-Seren (Anti-Ei, Anti-Vitellogenin und Anti-Hämolymphe) zeigen nur schwache bis keine Teilidentitäten.

Grundlage meines Ansatzes und ähnlicher Versuche anderer Arbeitsgruppen über die Evolution der Vitellogenine waren folgende Gedankenschwerpunkte:
für einen geringen Selektionsdruck und damit für eine "schnelle Evolution" d.h. die Möglichkeit neutraler Aminosäure-Substitutionen im Vitellogenin spricht seine Funktion. Als Nahrungsquelle für den Embryo sollte ein qualitativ ausgewogenes Aminosäureverhältnis ausreichen. Darüber hinaus wäre die Reihenfolge der Aminosäuren in der Polypeptidkette bzw. die davon abhängige Tertiärstruktur zweitrangig. Im Gegensatz dazu könnte die Aufnahme der Vitellogenine in die Oocyten, sie wird voraussichtlich durch spezifische Rezeptoren vermittelt (Telfer, 1977), mit einer solchen Strukturspezifität zusammenhängen, so daß ein Selektionsdruck auf das Vitellogenin besteht. Wie jedoch Telfer (196o) und Kunkel & Pan (1976) an Lepidopteren und Schaben zeigen konnten, ist die Aufnahme der Vitellogenine in die Oocyten streng artspezifisch, was gegen einen solchen Aufnahme-

mechanismus spricht. Zu ähnlichen Ergebnissen kam Bell (1972) anhand von Ovartransplantationen zwischen verschiedenen Schaben-Arten. Die transplantierten Ovarien reiften nur bei Austausch auf Subfamilien-Ebene, jedoch nicht zwischen Arten aus verschiedenen Familien oder Superfamilien.

Die Ergebnisse meiner Versuche: keine Kreuzreaktion zwischen den genomischen DNS-Restriktions-Fragmenten von APIS MELLIFERA und den verwendeten DROSOPHILA- bzw. Hühner-DNS Klonen, steht zu den bisher gefundenen Ergebnissen in keinem Widerspruch. Harnish & White (1982) erhielten bei immunologischen Kreuztests nur positive Ergebnisse innerhalb des Familienniveaus wie z.B. zwischen LOCUSTA MIGRATORIA und SCHISTOCERCA GREGARIA. Hierfür sprechen auch die an CYPRINIDEN und POECILIDEN gewonnenen Befunde von te Heesen (1977). Trotz ihrer geringen SΔQ-Werte, die die Autoren bei dem Vergleich der Aminosäure-Zusammensetzung der verschiedenen Vitelline finden und die für eine Konservierung der Proteine sprechen könnten, interpretieren auch sie ihre Ergebnisse mit einer möglichen "schnellen Evolution" der Vitellogenine und Vitelline. Während Huybrechts & de Loof (1982) mittels immunologischer Kreuztests zwischen verschiedenen Dipteren-Arten und Bownes (198o) mit immunologischen Methoden und Hybridisierungstechniken innerhalb von DROSOPHILA-Geschwister-Arten Übereinstimungen zwischen den Vitellogeninen bzw. ihren Genen fanden, konnte Kambysellis (1977) keine immunologische Kreuzreaktion zwischen DROSOPHILA MELANOGASTER und D. VIRILIS nachweisen (vgl. auch SRDic et al., 1981).
Eine schnelle evolutive Veränderung der Vitellogenine kann auch schon aufgrund der Tatsache vermutet werden, daß die Sequenzen der YP 1 und YP 2 Gene von DROSOPHILA MELANOGASTER sich zu 37% unterscheiden und der Unterschied zu dem YP 3 Gen noch größer ist (Wyatt et al., 1984). Eine Ausnahme stellen die Untersuchungsergebnisse von James et al. (1982) dar. Sie konnten mit verschiedenen Hybridisierungsexperimenten eine ungewöhnlich hohe Übereinstimmung zwischen dem XENOPUS-Vitellogenin-Gen und dem von LOCUSTA MIGRATORIA feststellen. Aber auch bei ihren Untersuchungen zeigten einige nicht explizit angegebene Insektenarten keinerlei Kreuzreaktion mit der genomischen bzw. der cDNS des LOCUSTA-Vitellogenins. In diesem

Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß Asher et al. (1983) mit Anti-LOCUSTA-Vitellogenin-Serum keine Kreuzreaktion mit Hühnchen-Lipovitellin und XENOPUS-Vitellogenin erhalten. Außerdem konnten Wyatt et al. (1984) keine Hybridisierung der zwei LOCUSTA-Vitellogenin-Gene untereinander nachweisen. Es bleibt daher noch offen, welche der DNS-Sequenzen zu solch starken Kreuzhybridisierungen führen oder ob die unterschiedlichen Ergebnisse auf die bereits eingangs (siehe I.) erwähnten methodischen Ursachen zurückzuführen sind.

V.
Zusammenfassung

Es wurde das Vorkommen des weibchen-spezifischen Dotterproteins Vitellogenin bei Drohnen der Honigbiene untersucht. Hierzu war es zunächst notwendig, die Hämolymph-Proteine der Drohnen, Königinnen und Arbeiterinnen zu charakterisieren. Nach dem eindeutigen Nachweis von Vitellogenin in der Drohnen-Hämolymphe wurden Versuche zur Aufklärung der hormonellen Regulation und den genetischen Bedingungen des Vitellogenin-Vorkommens bei Drohnen unternommen.

1. Vitellogenin und Vitellin konnte immunologisch eindeutig identifiziert werden. Es trat in besonders großen Mengen in der Hämolymphe eierlegender Arbeiterinnen, Königinnen und Ammenbienen auf.

2. Die native Vitellogenin-Fraktion ergab unter denaturierenden Bedingungen von SDS die Polypeptide Vg, a, b, e bzw. f. Von ihnen ist das Polypeptid Vg das weitaus prominenteste. Es kann daher als Vitellogenin angesprochen werden.

3. Das Vitellogenin der Bienen konnte als Phospho-Glyko-Protein mit einem Molekulargewicht von 18o K (in Anwesenheit von SDS) charakterisiert werden.

4. Die Polypeptide a, b, und e wurden auf ihre mögliche Beziehung zu Vitellogenin getestet.
   Bei Verwendung des in 2-dimensionaler Immun-Elektrophorese als monospezifisch ausgewiesenen Serums Anti-Vg(H) zeigten diese Peptide eine immunologische Identität mit Vitellogenin.
   Das Peptid b kann als Bruchstück des Polypeptides Vg angesehen werden.

Die hohe Übereinstimmung im Peptidmuster nach enzymatischem Verdau der Polypeptide Vg und a weist ebeso wie die immunologische Kreuzreaktion auf eine Teilidentität der beiden Peptide hin. Offen bleibt jedoch, ob das Peptid a eine Synthese-Vorstufe oder ein physiologisches Abbau-Produkt des Vitellogenin (Vg) ist.

5. Eine Verwandschaft der Vitellogenine zwischen APIS MELLIFERA, DROSOPHILA MELANOGASTER oder GALLUS DOMESTICUS, d.h. über die Familien-Ebene hinaus, konnte nicht gezeigt werden.

6. Das Vorkommen von Vitellogenin bei Drohnen konnte eindeutig nachgewiesen werden.
   Der Vitellogenin-Gehalt in der Drohnen-Hämolymphe unterliegt altersabhängigen Veränderungen, ist aber vom Gesamtprotein-Gehalt unabhängig. Der Synthesebeginn wird bei Drohnen in der Puppenphase vermutet, da bereits bei frisch geschlüpften Drohnen Spuren von Vitellogenin vorkommen.

7. Weder durch Juvenilhormon III- noch -Ecdyson-Injektionen verschiedener Dosierungen und Inkubationszeiten konnte eine signifikante Veränderung des Vitellogenin-Gehaltes in der Hämolymphe von Drohnen induziert werden. Es wurde lediglich ein allgemein erhöhter Proteingehalt nach Injektionen von -Ecdyson beobachtet.

   Das Auftreten neuer Proteine (X mit 68 K und x mit 37 K) nach Injektionen von JH III und -Ecdyson, jedoch auch von Ringer und Olivenöl, wird in Anlehnung an ähnliche Beobachtungen bei anderen Insekten im Zusammenhang mit "Streß"-Reaktion und Abwehrmechanismen diskutiert.

8. Besondere Aufmerksamkeit wurde den diploiden Drohnen gewidmet. Für die Eindeutigkeit des Ploidiegrades wurde der DNS-Gehalt der Spermien mittels Ultra-Mikro-Spektro-Photometrie bestimmt. Der DNS-Gehalt diploider Spermien beträgt o,29 pg/2C, der haploider Spermien o,14 pg/C.

Auch in der Hämolymphe diploider Drohnen konnte Vitellogenin nachgewiesen werden. Der relative Vitellogenin-Gehalt ist gegenüber dem der haploiden Drohnen gleichen Alters signifikant niedriger.

Das Vitellogenin-Vorkommen bei haploiden und diploiden Drohnen weist auf eine fehlende Repression des Vitellogenin-Gens im männlichen Geschlecht der Bienen hin. Aufgrund der Titerwerte ist jedoch eine geschlechts-spezifische Regulation der Titerhöhe zu vermuten. Diese Ergebnisse werden unter den Gesichtspunkten des Gen-Dosis-Effektes und der Geschlechts-Bestimmung der Bienen diskutiert.

VI.
Anhang

Abb.31

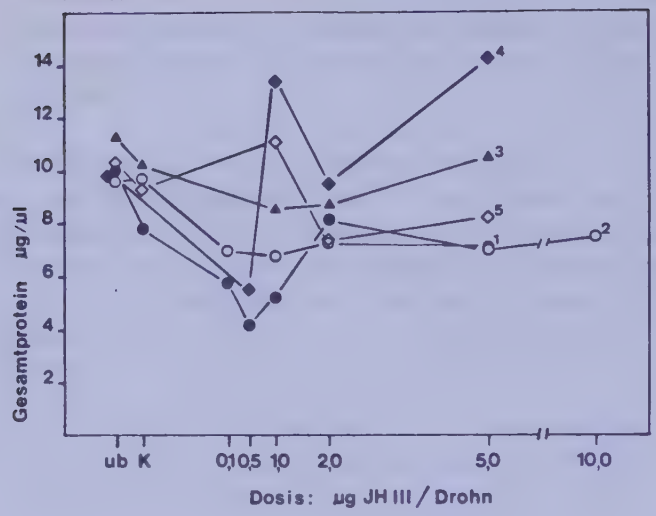
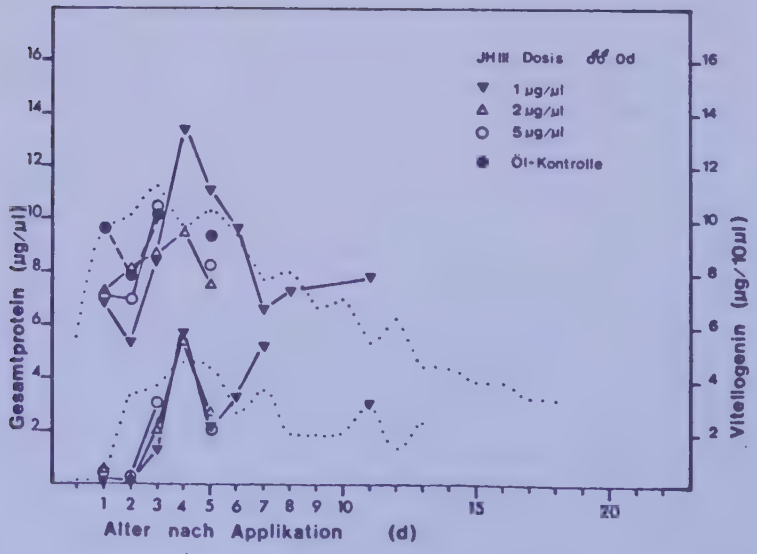

Gesamtprotein µg/µl
14
12
10
8
6
4
2
ub K
0,1
0,5
1,0
2,0
5,0
10,0
Dosis: µg JH III / Drohn
1
2
3
4
5

Abb.32


JH III Dosis
♂♂ Od
1 µg/µl
2 µg/µl
5 µg/µl
Öl-Kontrolle
Gesamtprotein (µg/µl)
Vitellogenin (µg/10µl)
16
14
12
10
8
6
4
2
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
15
20
Alter nach Applikation (d)

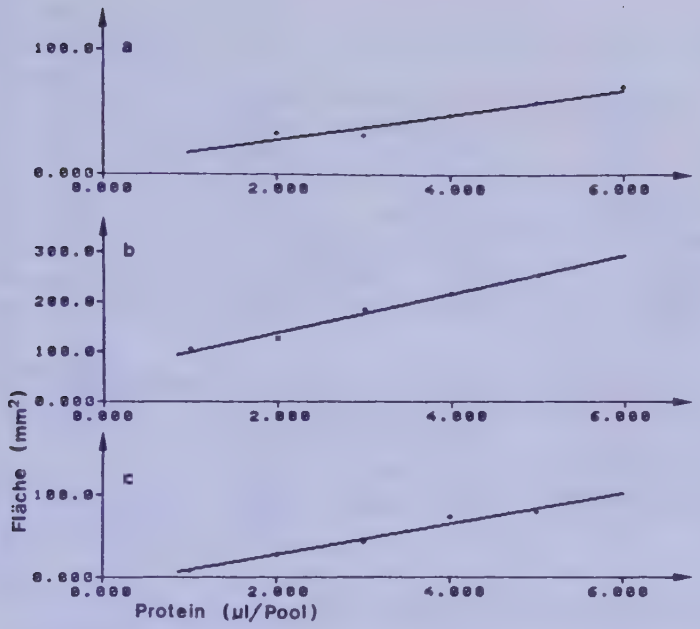


Abb.35:
Eichung der Coomassie Blue R 25o - Färbung von Proteinen, die mit SDS-PA-Gelen aufgetrennt wurden. Die Flächen der Extinktions-Peaks wurden mit dem "IBAS"-Standard-Program vermessen. Als Ausgangslösung dienten Molekulargewichtsmarker in SDS-Proben-Puffer (1mg/ml). Hiervon wurden 1, 2, 3, 4, 5 und 6 µl in die Geltaschen gegeben. Die photometrische Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von = 53o nm.

Abb.31:
Veränderung des Gesamtprotein-Gehaltes in Abhängigkeit der injizierten JH III-Dosis. Die Injektion erfolgte am Tag des Schlupfes der Drohnen.
ub = unbehandelte Kontrolltiere
K = mit Olivenöl injizierte Kontrolltiere
● = Präparation nach einer Inkubation von 1d
○ = " " " " " 2d
▲ = " " " " " 3d
◆ = " " " " " 4d
◇ = " " " " " 5d

Abb.32:
Abhängigkeit des Gesamtprotein-Gehaltes (obere Kurven) und Vitellogenin-Gehaltes (untere Kurven) von der Inkubations-Zeit nach einer Injektion von JH III. Die Titerkurven unbehandelter Drohnen sind mit ····· dargestellt.

Tabelle :9

Larvenaufzucht - diploide Drohnen

erfolgreiche Zuchtserien
(n=Anzahl der überlebenden Tiere)

Tage nach dem Umlarven (U)	Serie 3	5	6	7	8a	8b	1o	11	Schlupf	
	Diät II	II	II	II	VII	VIII	II	VIII		
U	56									
1	-	21o	16o	82	68	92	332	42		
2	18	194	143	77	64	88	27o	21		
3	18	189	137	67	56	8o	258	18		
4	16	169	1o6	57		73	25o	13		
5		166					231			
9							o	o		
1o							(Regen)			
11		9o								
12			56							
13				6	21	1o				
18			25							
19										
2o	1		3							
21		11	11	6	21	1o				
22		37	5							
23		3o								
24		6								
25	2									
26			1							
27		3	2							
28		5								
29		1								

in vitro

Pflegevolk

Schlupf: 2n ♀♀ | 2n ♂♂

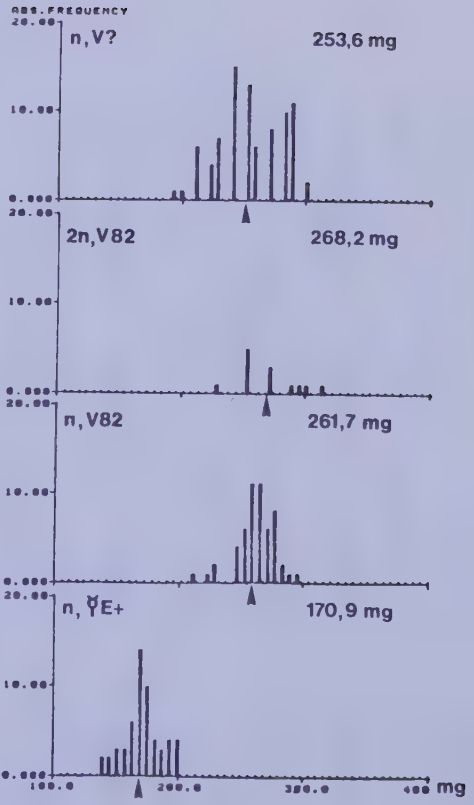


Abb.38 : Gewichtsverteilung haploider und diploider Drohnen unbekannter Herkunft (V?), aus dem Inzuchtvolk (V82) und von Arbeiterinnen (♀ E+). Alter der Drohnen ± 12h.
Mittelwert (►)

Literatur

Adams J., 1977
Estimation of the number of sex-alleles and queenmatings from diploid male frequencies in a population of APIS MELLIFERA.
Genetics 86: 583-596

Ashburner M., 1982
in: Schlesinger M.J. et al.: Heat shock: from bacteria to man
Cold Spring Harbor Lab. Press, N.Y., pp: 1-9

Ashburner M. & Bonner J.J., 1979
The induction of gene activity in DROSOPHILA by heat-shock.
Cell 17: 241-254

Asher C. et al., 1983
Determination of locust vitellogenin by radioimmuno-assay with (^{3}H)-propionyl-vitellogenin.
Gen. Comp. Endocrinology 52: 207-213

Atlas S.J. et al., 1978
Purification and partial characterization of CULEX PIPIENS FATIGANS yolk protein.
Insect Biochemistry 8: 111-115

Axelsen N. H., Krøll J., Weeke B., 1975
A manual of quantitative immunoelctrophoresis, Methods and applications,
Universitetsforlaget, Oslo

Baker B.S. & Belote J.M., 1983
Sex determination and dosage compensation in DROSOPHILA MELANOGASTER.
Ann. Rev. Genetics 17: 345-393

Baker B.S. & Ridge K.A., 1980
Sex and single cell
I. On the action of major loci affecting sex determination in DROSOPHILA MELANOGASTER.
Genetics 94. 383-423

Barnett T. et al., 1982
The isolation and chara terization of DROSOPHILA yolk protein genes.
Cell 21: 729-738

Bell W.J., 1972
Transplantation of ovaries into male PERIPLANETA AMERICANA: effects on vitellogenesis and vitellogenin secretion.
J. Insect Physiology 18: 851-855

Bergot B.J. et al., 1981
A method for quantitative determination of the four known JHs in insect tissue using GC/MS.
J. Chromatography (reprint 198o)

Berking E.W. et al., 1974
Estrogen-induced synthesis of yolk proteins in roosters.
Am. Zool. 14: 1177-1193

Bier K., 1963
Autoradiographische Untersuchungen über die Leistungen des Follikelepithels und der Nährzellen bei der Dotterbildung und Eiweißsynthese im Fliegenovar.
Roux' Archiv Entwickl.mech. 154: 552-575

Bier K. & Müller W., 1969
DNS-Messungen bei Insekten und eine Hypothese über retardierte Evolution und besonderen DNS-Reichtum im Tierreich.
Zool. Zbl. 88: 425-449

Boman H.G. et al., 1974
Insect Immunity I.
Characterization of an inducible cell-free immunity in insects
Infect. Immunology 1o: 136-145

Boman H.G. & Hultmark D., 1981
Cell-free immunity in insects
TIBS 6, 3o6-3o9

Boman H.G. & Steiner H., 1981
Humoral immunity in CECROPIA PUPAE.
Current Topics in Microbiology and Immunology 94/95: 75-92
(eds. Henle et al., Springer Verlag)

Bounais M., 1975
Les protéines de l'hémolymphe chez l'abeille APIS MELLIFERA MELLIFERA.
I. Larves, nymphes et adultes naissantes.
Apidologie 6(3): 2o7-218

Bownes M., 1980
The use of yolk protein variations in DROSOPHILA species to analyze the control of vitellogenesis.
Differentiation 16(2): 1o9-117

Bownes M., 1982a
The role of 2o-hydroxy-ecdysone in yolk-polypeptide synthesis by male and female fat bodies of DROSOPHILA MELANOGASTER.
J. Insect Physiology 28 (4): 317-328

Bownes M., 1982b
Ovarian yolk-protein synthesis in DROSOPHILA MELANOGASTER.
J.Insect Physiology 28(11): 953-96o

Bownes M., 1982c
Hormonal and genetic regulation of vitellogenesis in DROSOPHILA.
Quart. Rev. Biology 57(3): 247-274

Bownes M. & Nöthiger, 1981
Sex determining genes and vitellogenin synthesis in DROSOPHILA MELANOGASTER.
Mol. Gen. Genetics 182:222-228

Bownes M. et al., 1983a
Expression of the yolk-protein genes in the mutant doublesex (dsx^D) of DROSOPHILA MELANOGASTER.
JEEM 77: 241-157

Bownes M. et al., 1983b
2o-hydroxy-ecdysone stimulates tissue-specific yolk protein gene transcription in both male and female DROSOPHILA.
JEEM 78: 249-268

Bownes M. et al., 1984
Ecdysteroids in adult males and females of DROSOPHILA MELANOGASTER.
J. Insect Physiology 3o: 823-83o

Bradford M., 1976
A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.
Anal. Biochem. 72: 248-254

Brennan et al., 1982
The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in DROSOPHILA MELANOGASTER.
Dev. Biology 89: 225-236

Bridges C.B., 1916
Non-disjunction as a proof of the chromosome theory of heredity.
Genetics 1: 1-52

Bridges C.B., 1925
Sex in relation to chromosomes and genes.
Am. Naturalist 59: 127-137

O'Brien St.J. & Gethmann R.C., 1973
Segmental aneuploidy as a probe for structural genes in DROSOPHILA: Mitochondrial membrane enzymes.
Genetics 75: 155-167

Briers T. & de Loof A., 1980
The molting hormone activity in SARCOPHAGA BULLATA in relation to metamorphosis and reproduction.
Int. J. Invertebrate Reproduction 2: 363-372

Briers T. et al., 1983a
Ecdysteroid activity during metamorphosis and in male and female adults of four blowfly species.
Comp. Biochem. Physiology 74: 521-524

Briers T. et al., 1983b
Metabolism of injected ecdysone in female SARCOPHAGA BULLATA (Diptera).
Comp. Biochem. Physiology 75: 9-14

Briers T. et al., 1983c
Metabolism of injected (^{3}H)ecdysone in male SARCOPHAGA BULLATA.
Gen. & Comp. Endocrinology 52: 379-387

Briers T. & Huybrechts R., 1984
Control of vitellogenin synthesis by ecdysone in SARCOPHAGA BULLATA.
J. Insect Physiology 14(2): 121-126

Britten R.J. & Davidson E.H., 1969
Gene regulation for higher cells: a theory.
Science 165: 349 ff

Bull J.J., 1983
Evolution of sex determining mechanisms.
Benjamin/Cummings Pub. Comp. Inc.

Calvert L. & Graber W.B., 1978
Proteolytic digestion patterns of spectrin subunits.
FEBS-Letters 86(2): 247-249

Chalaye D., 1979
Étude immunologique des proteines hémolymphatiques et ovocytaires de RHODNIUS PROLIXUS (Stal.).
Can. J. Zool. 57: 329-336

Chaud-Netto J., 1975
Sex determination in bees
II. Additivity of maleness genes in APIS MELLIFERA.
Genetics 79: 213-217

Chaud-Netto J., 1978
Morphological characterization of the diploid drones of africanized honeybees (APIS MELLIFERA ADANSONII).
Ciecia et cultura 3o(6)

Chen Th.T. et al., 1978
Vitellin and vitellogenin from locusts (LOCUSTA MIGRATORIA)
Properties and post-translational modification in the fat body.
J. Biol. Chemistry 253(15): 5325-5331

Chen Th.T. & Wyatt G.R., 1980
Juvenile hormone control of vitellogenin synthesis in LOCUSTA MIGRATORIA.
Reg. Ins. Dev. & Behav., Karpacz/Poland: 535-563

Cherbas L., 1973
The induction of an injury reaction in cultured haemocytes from saturniid pupae.
J. Insect Phys. 19: 2o11-2o23

Cleveland D.W. et al., 1977
Peptide mapping by limited proteolysis in SDS - and analysis by gel electrophoresis.
J. Biol. Chemistry 252: 11o2-11o6

Cline Th.W., 1979
A product of the maternally influenced sex-lethal gene determines sex in DROSOPHILA MELANOGASTER.
Genetics 91: 22

Cline Th.W., 1980
Autoregulatory functioning of a DROSOPHILA gene product that establishes and maintains the sexually determined state.
Genetics 92: 231-277

Cline Th.W., 1983
The interaction between daughterless and sex-lethal in triploids: a novel sex-transforming maternal effect linking sex-determination and dosage compensation in DROSOPHILA MELANOGASTER.
Dev. Biology 95: 26o-274

Cook et al., 1984
Induction of a new haemolymph glycoprotein in larvae of permissive hosts parasitized by CAMPOLETIS SONORENSIS.
Insect Biochemistry 14(1): 45

Crain W.R. et al., 1975
Contrasting patterns of DNA sequence arrangement in APIS MELLIFERA (honeybee) and MUSCA DOMESTICA (house fly).
Chromosoma 59: 1-12

Croizier R.H., 1971
Heterozygosity and sex determination in haplo-diploidy.
American Naturalist 1o5 (945): 399-412

Croizier R.H., 1977
Evolutionary genetics of the hymenoptera.
Ann. Rev. Entomology 22: 263-288

Cunha A.B. & Kerr W.E., 1957
A genetical theory to explain sex-determination by arrhenotokous parthenogenesis.
Forma et functio 1(4): 33-36

Cutting J.A. & Roth T.F., 1973
Staining of phosphoproteins on acrylamide gel electropherograms.
Analyt. Biochemistry 54: 386-394

Daerr E., 1978
Effekte einer Allatektomie frischgeschlüpfter Bienenköniginnen auf Hochzeitsflug und Eiablage.
Mitt. dtsch. Ges. allg. angew. Ent. 1: 317-319

Davidson E.H. et al., 1975
Comparative aspects of DNA organization in metazoa.
Chromosoma 51: 253-259

Denhardt D.J., 1966
A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 23: 641-646

Dhadialla T.S. & Wyatt G.R., 1981
Juvenile hormone-dependent vitellogenin synthesis in LOCUSTA MIGRATORIA fatbody: Inductivity related to sex and stage.
Dev. Biology 96:436-444

Dobzhansky T., 1928
The reproductive system of triploid intersexes in DROSOPHILA MELANOGASTER.
Amer. Naturalist 62: 425-434

Dobzhansky T., 1931
Interaction between female and male parts in gynandromorphs of DROSOPHILA MELANOGASTER.
W. Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. 123: 719-746

Drescher W., 1969
Die Flugaktivität von Drohnen der Rassen APIS MELLIFICA CARNICA L. und APIS MELLIFICA LIGUSTICA L. in Abhängigkeit von Lebensalter und Witterung.
Z. Bienenforschung 9: 39o-4o9

Drescher W., 1975
Die räumliche und anteilmäßige Verteilung männlichen und weiblichen Gewebes in der äußeren Morphologie gynandromorpher Individuen bei APIS MELLIFICA L..
Insectes Sociaux 22(1): 13-26

Drescher W. & Rothenbuhler W.C., 1964
Sex determination in the honey bee.
J. Heredity 55: 91-96

Dubbel W., 1982
FPLC - schnelle Chromatographie von Proteinen.
GIT.Lab.Med. 5: 276-282

Dübendorfer A., 1971
Untersuchungen zum Anlagenplan und Determinationszustand der weiblichen Genital- und Analprimordien von MUSCA DOMESTICA.
W. Roux' Archives 168: 142-168

Engelmann F., 1976
The physiology of insect reproduction
chapter 2: Sex determination
Pergamon Press, Oxford

Engelmann F., 1979
Endocrine control of vitellogenin synthesis
in: Insect physiology in the future
eds. M. Locke & D.S. Smith
Academic Press

Engelmann F., 1979
Insect vitellogenin:
Identification, biosynthesis, and role in vitellogenesis.
Adv. Insect Physiol. 14: 49-1o8

Engelmann F.& Friedel T., 1974
Insect yolk protein precursor, a juvenile hormone induced phosphoprotein.
Life Science 14: 587-594

Engels W., 1972
Quantitative Untersuchungen zum Dotterprotein-Haushalt der Honigbiene (APIS MELLIFERA).
W. Roux' Archiv 171: 55-86

Engels W. & Fahrenhorst H., 1974
Alters- und kastenspezifiscje Veränderungen der Haemolymph-Protein-Spektren bei APIS MELLIFICA.
W. Roux' Archiv 174: 285-296

Engels W. et al., 1975
Weibchen-spezifische Hämolymph-Proteine bei Gynandern von APIS MELLIFICA.
W. Roux' Archiv 178: 79-88

Engels, 1978
Der Einfluß verschiedener Juvenilhormone und Dosierungen auf den Vitellogenin-Stoffwechsel eierlegender Bienenköniginnen (APIS MELLIFICA).
Mitt. dtsch. Ges. allg. angew. Ent. 1: 3o8-312

Engström A. et al., 1984
Insect immunity.
The primary structure of the antibacterial protein attacin F and its relation to two native attacins from HYALOPHORA CECROPIA.
EMBO 3(9): 2o65-2o7o

Fahrenhorst, 1973
Alters-, Kasten- und Genotyp- bedingte Unterschiede im Protein-Spektrum der Haemolymphe bei APIS MELLIFICA unter besonderer Berücksichtigung des Dotterproteins.
Staatsexamensarbeit, Münster

Fahrenhorst H., 1975
Entwicklungsphysiologische und cytologische Untersuchungen über die Evolution der Gattung APIS.
Inaugural-Dissertation, Münster

Fallon A.M. et al., 1974
Activation of vitellogenin synthesis in the mosquito AEDES AEG. by ecdysone.
J. Insect Phys. 2o: 1815-1823

Faye I. et al., 1975
Insect immunity II.
Simultaneous induction of antibacterial activity and selective synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of HYALOPHORA CECROPIA and SAMIA CYNTHIA.
Infect. Immunology 12: 1426-1438

Faye I. & Wyatt G.R., 1980
The synthesis of antibacterial proteins in isolated fatbody from CECROPIA silk moth pupae.
Experentia 36: 1325-1326

Fluri P. et al., 1981
Blood juvenile hormone, protein and vitellogenin titers in laying queen honeybees.
J. Apic. Research 2o(4): 221-225

Fyg W., 1973
Über den Einfluß von Metamorphosehäutungen und Ligaturen auf die Spermatogenese der Honigbiene (APIS MELLIFERA).
Apidologie 4(3): 227-265

Gardner & Snustad, 1981
Principles of Genetics.
J. Wiley & Sons, Inc.,

Garofalo C.A. & Kerr W.E., 1975
Sex determination in bees.
I. Balance between femaleness and maleness genes in BOMBUS ATRATUS Franklin (Hymenoptera, Apidae).
Genetica 45: 2o3-2o9

Gilliam M. & Jeter W.S., 1970
Synthesis of agglutinating substances in adult honeybees against BACILLUS LARVAE.
J. Invertebrate Pathology 16: 69-7o

Goldschmidt R., 1954
Different philosophies of genetics.
Science 119: 7o3-71o

Hagedorn H.H. & Kunkel J.G., 1979
Vitellogenin and Vitellin in insects
Ann. Rev. Entomolygy 24: 475-5o5

Hagmeister A., 1973
Immunologische Untersuchungen über extraoocytäres Vorkommen und interspezifische Unterschiede von Dotterproteinen in der Gattung APIS.
Staatsexamensarbeit, Münster

Hagmeister A., 1976
Immunologische Untersuchungen an Hämolymph- und Eiproteinen von Honigbienen unter besonderer Berücksichtigung der Dotterproteine und interspezifische Vergleiche.
Inaugural-Dissertation, Münster

Handler A.M., 1982
Ecdysteroid titers during pupal and adult development in DROSOPHILA MELANOGASTER.
Dev. Biology 93(1): 73-82

Harnish D.G. & White B.N., 1981
Insect vitellins identification purification and characterization from eight orders.
J. exp. Zoology 22o(1): 1-1o

Harnish D.G. & White B.N., 1982
An evolutionary model for the insect vitellins.
J. Molec. Evolution 18: 4o5-413

Haydack M.H., 1943
Larval food and development of castes in the honey bee.
J. Econ. Entomol. 36: 778-792

Haydack M.H., 197o
Honey bee nutrition.
Ann. Rev. Ent.15: 143-156

Hedrick J.L. & Smith A.J., 1968
Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis.
Arch. Biochem. Biophys. 126: 155-164

te Heesen D., 1977
Immunologische Untersuchungen an exo- und endogenen Dotter-proteinen von BRACHYDANIO RERIO (Teleostei, Cyprinidae) u. verwandten Arten.
Zool. Jb. Anat. 97: 566-582

Hodgetts R.B. et al., 1977
Ecdysone titers during postembryonic development of DROSOPHILA MELANOGASTER.
Dev. Biology 6o, 31o-317

Hoffmann D., 1980
Induction of antibacterial activity in the blood of the migratory locust LOCUSTA MIGRATORIA.
J. Insect Physiology 26: 539-549

Hoffmann D. et al., 1981
Insect immunity:
GALLERIA MELLONELLA and other lepidoptera have cecropia-P9-like factors active against gram negative bacteria.
Insect Biochemistry 11: 557-548

Holmquist G., 1972
Transcription rates of individual polytene chromosome bands: effects of gene dose and sex in DROSOPHILA.
Chromosoma 36: 413-452

Hoshiba H. et al., 1981
The diploid drone of CERANA JAPONICA and its chromosomes.
J. Apic. Res. 2o(3): 143-147

Hovemann B. et al., 1981
Vitellogenin in DROSOPHILA MELANOGASTER sequence of the yolk protein I gene and its flanking regions.
Nucl. Acid Res. 9(18): 4721-4734

Hughes J.A. et al., 1983
Bacteria-induced haemolymph proteins of MANDUCA SEXTA pupae and larvae.
J. Insect Physiology 29(8): 625-632

Hultmark D., 1980
Insect immunity
Purification and properties of three inducible bacterial proteins from haemolymph of immunized pupae of HYALOPHORA CECROPIA.
Eur. J. Biochemistry 1o6: 7-16

Hultmark D. et al., 1983a
Insect immunity
Isolation and structure of cecropin D and four minor anti-bacterial components from CECROPIA pupae.
Eur. J. Biochemistry 127: 2o7-217

Hultmark D. et al., 1983b
Insect immunity
Attacins, a family of antibacterial proteins from HYALOPHORA CECROPIA.
EMBO-Journal 2(4): 571-576

Huybrechts R. & de Loof A., 1977
Induction of vitellogenin synthesis in male SARCOPHAGA BULLATA by ecdysterone.
J. Insect Physiology 11/12: 1359-1362

Huybrechts R. & de Loof A., 1981
Effect of ecdysterone on vitellogenin concentration in haemolymph of male and female SARCOPHAGA BULLATA.
Int. J. Invertebrate Reproduction 3: 157-168

Huybrechts R. & de Loof A., 1982
Similarities in vitellogenin and control of vitellogenin synthesis within the genera SARCOPHAGA, CALLIPHORA, PHORMIA, and LUCILIA.
Comp. Biochem. Physiology 27 B: 339-344

Imboden H. et al., 1976
Die Vitellogeninsynthesebei der Bienen-Arbeiterin (APIS MELLIFERA) und ihre Abhängigkeit von Juvenilhormon (JH).
Rev. Suisse Zool. 83(4): 928-933

James T.C. et al., 1982
Evolutionary conversation of vitellogenin genes.
DNA 1(4): 345-353

Jordan R. & Brosemer R., 1974
Characterization of DNA from three bee species.
J. Insect Physiol. 2513-252o

Kaatz H., 1980
Untersuchungen zur Initiation der Vitellogenin-Synthese bei der Bienenkönigin.
Diplomarbeit, Tübingen

Kaatz H., 1984
Queen honeybee vitellogenin synthesis in vivo and in vitro.
Adv. Invertebrate Repr. 3: 6oo

Kaatz, Dissertation (Tübingen), in Vorbereitung

Kaatz H. & Hagedorn H.H., 1984
In vitro culture of honeybee ovary and fat body.
Adv. Invertebrate Repr. 3: 6oo

Kambysellis M.P., 1977
Genetic and hormonal regulation of vitellogenesis in DROSOPHILA.
Am. Zool. 17: 535-549

Kelly P.M. & Schlesinger M.J., 1982
Antibodies to two major chicken heat shock proteins crossreact with similiar proteins in widely divergent species.
Mol. Cell. Biol 2: 267-274

Kelly T.J. & Telfer W. H., 1977
Antigenic and electrophoretic variants of vitellogenin in ONCOPELTUS blood and their control by juvenile hormone.
Dev. Biol. 61: 58-69

Kerr W.E., 1962
Genetics of sex determination.
Ann. Rev. Ent 7: 157-176

Kerr W.E., 1967
Multiple alleles and genetic load in bees.
J. Apic. Res. 6(2): 61-64

Kerr W.E., 1974
Advances in cytology and genetics in bees.
Ann. Rev. Ent. 19: 253-268

Kerr W.E., 1975
Evolution of the population structure in bees.
Genetics 79: 73-84

Kerr W.E. & Laidlaw H.H., 1956
General genetics of bees.
Adv. Genetics 8: 1o9-153

Kerr W.E. & Nielsen R.A., 1967
Sex determination in bees (APINAE).
J. Apic. Res. 6(1): 3-8

Korge G., 1970
Dosiskompensation und Dosiseffekt für RNS-Synthese in Chromosomen-puffs von DROSOPHILA MELANOGASTER.
Chromosoma 3o: 43o-464

Krøll J. & Anderson M., 1976
Specific antisera produced by immunization with precipitin lines.
J. Immunol. Meth. 13: 125-13o

Kunkel J.G. & Pan M.L., 1976
Selectivity of yolk protein uptake:
Comparison of vitellogenins of two insects.
J. Insect Physiology 22: 8o9-818

Kunkel J.G. et al., 1984
Vitellogenin of the german cockroach, BLATELLA GERMANICA, structure and function of high mannose oligosaccharide in secretion, uptake and storage.
XVII Int. Congr. of Entomol., Hamburg: 275 (poster)

van Laere O., 1971
Physiology of the honeybee corpora allata.
I. Studies on queens, drones, and workers kept in natural conditions.
J. Apic. Res. 1o(3): 119-124

Lakhotia S.C. & Mukherjee A.S., 1969
Chromosomal basis of dosage compensation in DROSOPHILA.
I. Cellular autonomy of hyperactivity of the male-X-chromosome in salivary glands and sex differentiation.
Genet. Res. Camb. 14: 137-15o

Lambin P., 1978
Reliability of molecular weight determination of proteins by polyacrylamide gradient gel electrophoresis in the presence of SDS.
Anal. Biochem. 85: 14-125

Lamotke G., 1969
Neurosekretion im Gehirn von Drohnen.
Z. Bienenforschung 9: 434-451

Lamy M. & Julien-Laferrière N., 1975
Comme chez la femelles, la vitellogenèse en milieu mâle est independante des glandes endocrines chez le ver à soie, BOMBYX MORI L. (Lepidoptera).
Annales d'Endocrinol. 37: 531-532

Lamy M. et al., 1978
Vitellogenèse protéique en milieu mâle chez le lépidoptere pyralide GALLERIA MELLONELLA.
C. R. Acad. Sc. France, D. 286: 883-885

Lamy M., 1979
Vitellogenèse en milieu mâle chez les lépidopteres.
Aspects endocrinologgiques et protéique.
Annee biol. 18: 335-371

Lensky Y., 1970
Haemolymph proteins of the honeybee II.
Differentiation during the development of bee workers.
Comp. Biochem. Physiol. 39 B: 335-341

Lensky Y. & Rakover Y., 1983
Separate protein body compartements of the worker honeybee (APIS MELLIFERA L.).
Comp. Biochem. Physiol. 75 B: 6o7-615

Lensky Y. & Skolnik H., 1980
Immunochemical and electrophoretical identification of the vitellogenin proteins of the queen bee (APIS MELLIFERA).
Comp. Biochem. Physiol. 66 B: 185-193

Lindquist S., 1981
Regulation of protein synthesis during heat shock.
Nature 293: 311

de Loof A. et al., 1976
A novel method for the quantitative extraction of juvenile hormones from insects including the silverfish, THERMOBIN DOMESTICA.
J. Insect Phys. 23: 829-832

de Loof A. & van Loon J., 1980
A redescription of the galleria bioassay for juvenile hormones and compounds with juvenile hormone activity.
Ann. Soc. R. Zool. Belg. 1o9(1): 19-28

Lucchesi J.C., 1978
Gene dosage compensation and the evolution of sex chromosomes.
Science 2o2: 711-716

Lucchesi J., 1983
The relationship between gene dosage, gene expression, and sex in DROSOPHILA MELANOGASTER.
Dev. Genetics 275-282

Lucchesi J.C. & Skripsky Th., 1981
The link between dosage compensation and sex-differentiation in DROSOPHILA MELANOGASTER.
Chromosoma 82: 217-227

Mackensen O., 1951
Viability and sex determination in the honeybee (APIS MELLIFERA).
Genetics 36: 5oo-5o9

Mackensen O. & Roberts W.C., 1948
A manual for the artifical insemination of queen bees.
U.S. Bur. Ent. and Plant Quar. ET-25o: 33

Mainx, 1979
Die Wirkungsweise der gonosomalen Geschlechtsbestimmung
in: Handbuch der Zoologie 4(2), 1/12: 44-45

Maniatis T. et al., 1982
Molecular cloning.
Cold Spring Harbor Lab.

Maroni G. & Plaut W., 1973
Dosage compensation in Drosophila melanogaster triploids.
I. Autoradiographic study.
Chromosoma 4o: 361-377

Mindt B., 1962
Untersuchungen über das Leben der Drohnen, insbesondere Ernährung und Geschlechtsreife.
Z. Bienenforsch. 6(1): 9-33

Mirsky A.E. & Ris H., 1951
The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance.
J. Gen. Physiol. 34: 451

Mohrig W. & Messner B., 1968
Immunreaktion bei Insekten.
I. Lysozym als grundlegender antibakterieller Faktor im humoralen Abwehrmechanismus der Insekten.
Biol. Zbl. 87: 439-47o

II. Lysozym als antimikrobielles Agens im Darmtrakt von Insekten.
Biol. Zbl. 87: 7o5-718

Mukherjee A.S. & Beermann W., 1965
Synthesis of ribonucleic acid by the X-chromosomes of DROSOPHILA MELANOGASTER and the problem of dosage compensation.
Nature 2o7(4998): 785-786

Muller H.J., 1932
Further studies on the nature and causes of gene mutations.
Proc. 6th Int. Congr. Genet., ed. D.F. Jones, 1: 213-25

Muller H.J., 1950
Evidence of precision of genetic adaption.
Harvey Lect. 43: 165-229

Mundall E.C. et al., 1979
Induction of vitellogenin and growth of implanted oocytes in male cockroaches.
Nature 282: 97-98

Mundall E.C. et al., 1983
Vitellogenin induced in adult male DIPLOPTERA PUNCTATA by JH and JHA: Identification and quantitative aspects.
J. Insect Physiol. 29(2): 2o1-2o7

Nöthiger R. et al., 1977
Gynandromorphs reveal two seperate primordia for male and female genitalia in DROSOPHILA MELANOGASTER.
W. Roux' Archives 181: 367-373

Ota T. et al., 1981
Interactions between sex-transformation mutants of DROSOPHILA MELANOGASTER.
I. Haemolymph vitellogenins and gonad morphology.
Genetics 99: 429-441

Pan M.L. et al., 1969
Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body.
Science 165: 393-394

Paulino Z., 1977
Relatorio Semestral de Pesquisa, Univ. Sao Paulo

Paulino Simoẽs Z., 1984
Haploid and diploid honeybee drones are JH sensitive: female specific proteins in fat body and hemolymph.
Adv. Invertebrate Repr. 3: 622

Pereira S.D. & de Bianchi A.G., 1983
Vitellogenin and vitellin of RHYNCHOSCIARA AMERICANA: further characterization and time of synthesis.
Insect Biochem. 13(3): 323-332

Poduslo J.F., 1981
Glycoprotein molecular-weight estimation using SDS-pore-gradient-electrophoresis. Comparison of Tris-Glycin and Tris-Borate-EDTA-buffer systems.
Anal. Biochem. 114: 131-139

Postlethwait J.H. et al., 1980
Sexual phenotype and vitellogenin synthesis in DROSOPHILA.
Dev. Biol. 79: 379-387

Postlethwait J.H. & Jowett T., 1980
Genetic analysis of the hormonally regulated yolk polypeptide genes in DROSOPHILA MELANOGASTER.
Cell 2o: 671-678

Postlethwait J.H. & Shirk P.D., 1981
Genetic and endocrine regulation of vitellogenesis in DROSOPHILA.
Am. Zool. 21: 687-7oo

Ramamurty P.S. & Engels W., 1977
Allatectomy and juvenile hormone effects on synthesis and incorporation of vitellogenin in the honeybee queen (APIS MELLIFEA).
Zool. Jb. Physiol. 81: 165-176

Rankin M.A. & Jäckle H., 1980
Hormonal control of vitellogenin synthesis in ONCOPELTHUS FASCIATUS.
J. Insect Phys. 26: 671-684

Ranney R.E. & Chaikoff I.L., 1951
The maternal synthesis of egg yolk protein as demostrated by isotopic and serological means.
Biochim. Biophys. Acta 22: 38-42

Rasch E.M. et al., 1971
The DNA content of sperm of DROSOPHILA MELANOGASTER.
Chromosoma 33: 1 ff

Rasch E.M. et al., 1975
Evidence for dosage compensation in parthenogenetic hymenoptera.
Chromosoma 59: 323-34o

Regel R., 1978
Auswirkungen einer Langzeitbehandlung mit unterschiedlichen Dosen von Juvenilhormon III auf Verhalten und Fertilität von Jungköniginnen (APIS MELLIFICA).
Mitt. dtsch. Ges. allg. angew. Ent. 1: 313-316

Rembold H., 1984
What means zero juvenile hormone concentration in absolute physiological terms?
XVII. Int. Cong. of Entomol., Hamburg: 258 (Vortrag)

Rembold H. & Lackner B., 1981
Rearing of honey bee larvae in vitro: Effect of yeast extract on queen differentiation.
J. Apic. Res. 2o: 165-171

Rigby P.W.R. et al., 1977
Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.
J. Mol. Biol. 113: 237-251

Risau W., 1980
Verfahren zur Charakterisierung von Antigenen in einer komplexen Proteinmischung.
Diplomarbeit, Tübingen

Röseler P.F., 1977
Juvenile hormone control of oogenesis in bumblebee workers BOMBUS TERRESTRIS.
J. Insect Physiol. 23: 985-992

Röseler P.F. & Röseler I., 1978
Studies on the regulation of the juvenile hormone titre in bumblebee workers, BOMBUS TERRESTRIS.
J. Insect Physiol. 24: 7o7-713

Ron A. & Wheathy D.N., 1984
"Stress-proteins" are induced in TETRAHYMENA PYRIFORMIS by histidinol but not in mammalian (L-929) cells.
Exp. Cell. Res. 153: 158-166

Rothschild, Lord, 1955
The spermatozoa of the honey-bee.
Trans. R. Ent. Soc. London 1o7: 289-294

Rudack D. & Wallace R.A., 1968
On the side of phosvitin synthesis in XENOPUS LAEVIS.
Biochim. Biophys. Acta 155: 299-3o1

Rutz W. & Lüscher M., 1974
The occurence of vitellogenin in workers and queens of APIS MELLIFICA and the possibility of its transmission to the queen.
J. Insect Physiol. 2o: 897-9o9

Rutz W. et al., 1976
The function of juvenile hormone in adult worker honeybees, APIS MELLIFERA.
J. Insect Physiol. 22: 1-7

Sachs L., 1982
Stastistische Auswertungs-Methoden
Springer Verlag, 1969

Sangh J.H., 1984
Genetics and development.
Longman Inc., New York

Schleif & Wensink, 1981
Practical methods in molecular biology.
Springer Verlag Inc. New York

Seecof R.L. et al., 1969
Dosage compensation for enzyme activities in DROSOPHILA MELANOGASTER.
Genetics 62: 528-535

Segrest J.P. & Jackson R.L., 1972
Molecular weight determination of glycoproteins bei PAGE in SDS.
Meth. Enzymology 28B: 54-63

Senghbusch P. von, 1979
Molekular- und Zellbiologie.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

Sibatani A., 1950
Effects of histone and other proteins on the Feulgen reaction.
Nature 166: 355-356

Slater G.G., 1969
Stable pattern formation and determination of molecular size by pore-limited electrophoresis.
Anal. Chem. 41(8): 1o39-1o41

Smith P.D. & Lucchesi J.C., 1969
The role of sexuality in dosage compensation in DROSOPHILA.
Genetics 61: 6o7-618

Soares A.E.E. & Chaud-Netto J., 1982
Laranja - an additional eye color gene in the snow series of APIS MELLIFERA L..
J. Heredity 73: 8o

Southern E.M., 1975
Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98: 5o3-517

Srdic Z. et al., 1978
Yolk protein differences between species of DROSOPHILA.
Experentia 34: 1572

Srdic Z. et al., 1979
Autonomous yolk protein synthesis in ovaries of DROSOPHILA cultured in vivo.
W. Roux' Archieves 187: 255-266

Stern C., 1929
Über die additive Wirkung multipler Allele.
Biol. Zb. 49: 261-29o

Stern C., 1960
Dosage compensation: development of a concept and new facts.
Can. J. Genet. Cytol. 2: 1o5-118

Szibbo C. & Tobe S.S., 1982
Intrinsic differences in juvenile hormone synthetic ability between corpora allata of male and female DIPLOPTERA PUNCTATA.
Gen. Comp. Endocrin. 46: 533-54o

Tata J.R., 1976
The expression of the vitellogenin gene.
Cell 9: 1-14

Tata J.R., 1979
Vitellogenesis: a versatile model for hormonal regulation of gene expression.
Recent. Prog. Hormone Res. 35: 47-9o

Telfer W.H., 1954
Immunological studies of insect metamorphosis.
II. The role of a sex-limited blood protein in egg formation by the CECROPIA silkworm.
J. Gen. Physiol. 37: 539-558

Telfer W.H. , 1960
The selective accumulation of blood proteins by the oocytes of saturniid moths.
Biol. Bull. 118: 338-351

Telfer W.H., 1984
Isolated hemolymph proteins as probes of endocytotic yolk formation in HYALOPHORA CECROPIA.
Adv. Invertebrate Repr. 3: 81-86

Telfer W.H. et. al., 1976
Intrafollicular protein secretion during vitellogenesis in HYALOPHORA CECROPIA.
XV. Int. Congr. of Entomol., Washington

Telfer W.H. & Rutberg L.D., 196o
The effects of blood protein depletion on the growth of the oocytes in the cecropia moth.
Biol. Bull. 118: 352-366

Telfer W.H. & Smith D.S., 1970
Aspects of egg formation.
in: "Insect Ultrastructure", ed. A.C. Neville: 117-134
Royal. Entomol. Soc. London

La Thangue N.B., 1984
Herpes simplex virus infection causes the accummulation of a heat-shock protein.
EMBO-J. 3(2): 267-277

Thomson J.A. et al., 1976
Genetics of Lucilin, a storage protein from the sheep blowfly, LUCILIA CUPRINA (Calliphoridae).
Biochem. Genetics 14 (1/2): 145-159

Tobe S.S. et al., 1979
Corpus allatum function during sexual maturation of male DIPLOPTERA PUNCTATA.
Physiol. Entomol. 4: 79-86

Tobler J.et al., 1971
Gene modulation in DROSOPHILA:
Dosage compensation and relocated v^+ genes.
Biochem. Genentics 5: 111-117

Towbin H. et al., 1979
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets:
procedure and some applications.
PNAS,USA 76: 435o-4354

Trautman et al., 1974
Evidence of the juvenile hormone methyl (2E, 6E)-1o,11,-epoxy-3,7,11-trimethyl-2,6-dodecadienoate (JH III) in insects of four orders.
Z. Naturforsch. 29c: 757-759

Trenczek T., 1979
Vitellogenin-Vorkommen und Juvenilhormon-Titer bei APIS MELLIFICA mit besonderer Berücksichtigung der Drohnen.
Diplomarbeit, Tübingen

Trenczek T., 1984
Vitellogenin in honeybee drones of APIS MELLIFERA.
Adv. Invertebrate Repr. 3: 645

Wahli et al., 1981
Vitellogenesis ant the vitellogenin gene family.
Science 212: 298 ff

Wallace R.A. & Bergink E.W., 1974
Amphibian vitellogenin: properties, hormonal regulation of hepatic synthesis and ovarian uptake, and conversation to yolk proteins.
Amer. Zool. 14: 1159-1175

Wallace R.A. & Dumont J.N., 1968
The induced synthesis and transport of yolk proteins and their accumulation by the oocyte in XENOPUS LAEVIS.
J. Cell. Physiol. (Suppl.) 72: 73-89

Wallace R.A. & Jared D.W., 1968
Estrogen induces lipophosphoprotein in serum of male XENOPUS LAEVIS.
Science 16o: 91-92

Wang L.J. & Knowland J., 1975
Synthesis of vitellogenin in cultures of male and female frog liver regulated by estradiol treatment in vitro.
PNAS, USA. 72: 3172-3175

Weaver N., 1974
Control of dimorphism in the female honey bee.
3. Balance of nutrients.
J. Apic. Res. 13: 93-1o1

Whiting A., 1961
Genetics of HABROBRACON
Adv. Genetic 1o: 295-348

Whiting P.W., 1935
Sex determination in bees and wasps.
J. Heredity 26: 263-278

Whiting P.W., 1943
Multiple alleles in complementary sex determination of HABROBRACON.
Genetics 28: 365-382

Whiting P.W., 1945
The evolution of male haploidy.
Quart. Rev. Biol. 2o: 231-26o

Woyke J., 1962
The hatchability of "lethal" eggs in a two sex-allele fraternity of honeybees.
J. Apic. Res. 1: 6-13

Woyke J., 1963a
Rearing and viability of diploid drones.
J. Apic. Res. 2(2): 77-84

Woyke J., 1963b
Drone larvae from fertilized eggs of the honeybees.
J. Apic. Res. 2(1): 19-24

Woyke J., 1965
Genetic proof of the origin of drones from fertilized eggs of the honeybee.
J. Apic. Res. 4(1): 7-11

Woyke J., 1969a
A method of rearing diploid drones in a honeybee colony.
J. Apic. Res. 8(2): 65-74

Woyke J., 1969b
Rearing diploid drones on royal jelly or bee milk.
J. Apic. Res. 8(3): 169-173

Woyke J., 1973a
Reproductive organs of haploid and diploid drone honeybees.
J. Apic. Res. 12 (1): 35-51

Woyke J., 1973b
Laranja: a new honey bee mutation.
J. Heredity 64: 227-23o

Woyke J., 1974
Genic balance, heterozygosity and inheritance of size of testes in diploid drone honeybees.
J. Apic. Res. 13(2): 77-91

Woyke J., 1975
DNA content of spermatids and spermatozoa of haploid and diploid drone honeybees.
J. Apic. Res. 14(1): 3-8

Woyke J., 1977a
Comparative biometrical investigation on diploid drones of the honeybee.
I. The head.
J. Apic. Res. 16(3): 131-142

Woyke J., 1977b
Sex determination in the honeybee.
IUSSI-Congr., Wageningen, pp: 188-19o

Woyke J., 1978a
Comparative biometrical investigation on diploid drones of the honeybee.
II. The thorax.
J. Apic. Res. 17(4): 195-2o5

Woyke J., 1978b
Comparative biometrical investigation on diploid drones of the honeybee.
III. The abdomen, and weight.
J. Apic. Res. 17(4): 2o6-217

Woyke J., 1983
Lengths of haploid and diploid spermatozoa of the honeybee and the question of the production of triploid workers.
J. Apic. Res. 22(3): 146-149

Woyke J. & Knytel A., 1966
The chromosome number as proof that drones can arise from fertilized eggs of the honeybees.
J. Apic. Res. 5(3): 149-154

Woyke J. & Skowronek W., 1974
Spermatogenesis in diploid drones of the honeybee.
J. Apic. Res. 13(3): 183-19o

Wyatt G.R. & Pan M.L., 1978
Insect plasma proteins.
Ann. Rev. Biochem. 47: 779-817

Wyatt G.R. et al., 1984
The vitellogenin genes of LOCUSTA MIGRATORIA and other insects.
Adv. Invertebrate Repr. 3: 73-79

Zillikens A., 1984
Vitellogenin-Syntheserate bei imaginalen Bienendrohnen:
Abhängigkeit von Alter und Juvenilhormon.
Diplomarbeit, Tübingen

Meine akademischen Lehrer waren :

D. Ammermann, H. Ammon, W.F. Bentrup, J. Büning, E. Bünning,
D. Bunke, K. Drumm, W. Engels, W. Gölz, Gradmann, K.G. Grell,
J. Guglielmi, K.P. Hadeler, A. Hager, K. Hausen, G. Jung,
H.-J. Lipps, W. Lorenz, G. Mickoleit, F.P. Möhres, H. Netzel,
F. Oberwinkler, K. Pelling, H. Probst, W.. Rähle, A. Rieker,
B. Schwemmle, M. Siess, D. Wandschneider, G. Weizel, U. Winkler,
K. Wöhrmann, J. Zeil.

Lebenslauf

Name:	Eva Martina Trenczek
Geburtsdatum:	o4.o6.1954
Geburtsort:	Leipzig
Eltern:	Hans-Wolfgang Trenczek
	Annelies Trenczek

196o	Flucht aus der DDR
1961	Grundschule Neuwied/Rhein
1961-1965	Grundschule Heidenheim/Brenz
1965-1973	Schillergymnasium Heidenheim/Brenz
Juni 1973	Abitur
WS 73/74 - WS 79/8o	Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Tübingen
1978-1979	Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. W. Engels am Lehrstuhl für Entwicklungsphysiologie Thema: Vitellogenin-Vorkommen und Juvenilhormon-Titer bei Apis mellifica mit besonderer Berücksichtigung der Drohnen.
1979	Diplom im Fach Biologie
198o-1981	Wissenschaftliche Angestellte (DFG)
198o	Studienaufenthalt in Warschau/Polen bei Herrn Prof. Dr. J. Woyke (DAAD-Stipendium)
1981-1984	Promotion am Lehrstuhl für Entwicklungsphysiologie bei Herrn Prof. Dr. W. Engels über das Thema: Vitellogenin-Vorkommen bei Drohnen der Honigbiene (Apis mellifera L.).

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)